



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DE ANEMIAS HIPOCRÓMICAS E MICROCÍTICAS COM HB A₂ NORMAL

ANA CATARINA PINTO SILVA OLIVEIRA

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DE ANEMIAS HIPOCRÓMICAS E MICROCÍTICAS COM HB A₂ NORMAL

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Letícia Ribeiro, do Serviço de Hematologia-HG/HP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e co-orientação da Mestre Maria Celeste Bento, do Serviço de Hematologia-HG/HP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Agradecimentos

Pretendo deixar aqui uma palavra de sentida gratidão e inextinguível apreço a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O seu desenvolvimento em muito se deve à prestimosa colaboração da Professora Doutora Maria Letícia Ribeiro e da Mestre Maria Celeste Bento, a quem dirijo os meus sinceros agradecimentos, pela rica experiência pedagógica e laboral que me proporcionaram.

Quero ainda agradecer a todos os colegas que pacientemente partilharam comigo os seus conhecimentos ao longo de todo o Mestrado, os quais considero muito enriquecedores para a minha futura vida profissional.

A todos, sem exceção, o meu Muito Obrigado.

Júri

Professor Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Professora Doutora Margarida Maria de Carvalho Lima

Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto

Professora Doutora Maria Letícia de Sousa Ribeiro

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Maria Celeste Sena S. Miguel Bento Lago de Queiroz

Técnica Superior de Saúde - Genética, Assessora no Serviço de Hematologia do HG/HP-
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Resumo

Introdução - As anemias hipocrômicas e microcíticas, não sideropênicas, são, na sua maioria, de origem talassêmica. As talassémias são hemoglobinopatias caracterizadas pela redução ou ausência da produção de cadeias globínicas, provocadas por mutações nos genes globínicos. A β -talassémia está mais frequentemente associada a mutações pontuais e pequenas deleções ou inserções no gene *HBB*, enquanto que a α -talassémia normalmente resulta de deleções que eliminam os genes *HBA2* e/ou *HBA1*. Deleções de um só gene, $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, são frequentes entre africanos, mediterrânicos e asiáticos enquanto que grandes deleções que removem ambos os genes alfa, como a deleção do Sudeste Asiático ($-\alpha^{SEA}$), são comuns nas populações asiáticas. Grandes deleções nos *clusters* alfa e beta são condições raras, geralmente associadas a fenótipos severos. A identificação destas deleções é realizada através da técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*).

Objetivos - O objetivo principal deste trabalho foi estudar um grupo de indivíduos com hipocromia e microcitose e Hb A₂ normal, com suspeita de possuírem deleções nos *clusters* α ou β . Pretendeu-se, ainda, caracterizar a extensão das deleções encontradas e, quando possível, determinar a localização dos seus *breakpoints*.

Materiais e Métodos - Cinquenta e oito indivíduos (28 homens e 30 mulheres), com hipocromia e microcitose de origem desconhecida, seguidos na Consulta de Hematologia do Hospital Pediátrico e do Hospital Geral do CHC, ou enviados de outros centros, foram testados para a presença de deleções nos *clusters* α e β . Foram efetuados hemogramas a todas as amostras e os estudos de hemoglobina foram realizados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os estudos moleculares incluíram GAP-PCR, MLPA, sequenciação genética e PCR / hibridização reversa.

Resultados - Foi possível obter o padrão do rácio das sondas MLPA para as deleções α e β conhecidas ou já caracterizadas. Foram encontradas 6 deleções HBA desconhecidas que removem os genes α ou as regiões reguladoras desse *cluster*. Detetou-se, também, uma deleção no *cluster* β , que elimina praticamente todos os seus genes.

Conclusões - A identificação de grandes deleções nos *clusters* α e β -globínicos em indivíduos com hipocromia e microcitose, com HbA₂ normal, é crucial para o aconselhamento genético. A metodologia de MLPA é uma abordagem simples e fiável, muito útil para o diagnóstico de casos de talassemia, em que não são detetadas mutações α ou β através das técnicas convencionais.

Palavras-chave

Hipocromia, microcitose, MLPA, talassémias, deleções, HBA, HBB.

Abstract

Introduction - Hypochromic and microcytic anemias, non iron deficient, are mostly of thalassemic origin. Thalassemias are hemoglobinopathies characterized by reduction or absence of globin chains production, caused by mutations in globin genes. Most commonly β -thalassemia is associated to point mutations, small insertions or deletions in the *HBB* gene, whereas α -thalassemia is due to deletion of *HBA1/HBA2* genes. Deletions $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ are frequent among Africans, Mediterraneans and Asians, while large deletions, removing both α -genes, are frequent in Asiatic populations. Apart from Southeast Asian deletion ($--^{SEA}$), common in Asia, other large deletions in the α -genes cluster are rare conditions, usually associated with more severe phenotypes. Identification of large deletions can be performed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) techniques.

Objectives - The main objective of this work, was to study a group of subjects with microcytosis, hypochromia and normal Hb A₂ levels, suspected of possessing deletions in α or β globin clusters. In addition it was intended to characterize the extent of the deletions found and, if possible, determine the location of their breakpoints.

Materials & Methods - Fifty-eight subjects (28 males and 30 females), with hypochromia and microcytosis of unknown origin, followed in the hematology clinic of Hospital Pediátrico and Hospital Geral do CHC, or referred from other centres, were tested for deletions in the globin genes. Full blood counts were performed in all samples and hemoglobin (Hb) studies were done by high-performance liquid chromatography (HPLC). Molecular investigations included GAP-PCR, MLPA, gene sequencing and PCR/Reverse Hybridization.

Results - It was possible to obtain the MLPA signal probe pattern for known or already characterized α and β deletions. Six unknown α deletions were found, which remove the α genes or the regulatory regions of that cluster. It was also found a deletion in the β cluster, which causes a reduction of the signal intensities of almost all the HBB kit's probes.

Conclusions - Identification of α and β -globin cluster large deletions and/or insertions in individuals with hypochromia, microcytosis and normal HbA₂, is crucial for genetic counseling. MLPA methodology is a simple and reliable approach, very useful for the diagnosis of thalassemia cases with no α - or β -gene mutations detectable by classical techniques.

Keywords

Hypochromia, microcytosis, MLPA, thalassemias, deletions, HBA, HBB.

ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Hemoglobina	1
1.3. <i>Clusters</i> α e β globínicos	2
1.3.1. Estrutura e Localização	2
1.3.2. Regiões Reguladoras	3
1.4. Hemoglobinopatias	4
1.4.1. Talassémias	5
1.4.2. Variantes estruturais de Hemoglobina	13
1.5. Detecção de grandes deleções por MLPA.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Material e Métodos	19
3.1. Pacientes.....	19
3.2. Hemograma e Estudo de Hemoglobinas	19
3.3. Estudos Moleculares	20
3.3.1. GAP-PCR para deteção das α -talassémias delecionais mais frequentes ($\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$).....	20
3.3.1. GAP-PCR para deteção da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish	21
3.3.2. MLPA	21
3.3.3. Sequenciação genética	23
3.3.4. PCR e Hibridização reversa.....	23
4. Resultados.....	25

4.1.	Deteção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ no <i>cluster</i> α por GAP-PCR.....	25
4.2.	Deteção da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish por GAP-PCR.....	25
4.3.	Deteção das deleções menos frequentes nos <i>clusters</i> α e β por MLPA	26
4.4.	PCR e Hibridização reversa para confirmação da presença das deleções $--^{SEA}$ e $-\alpha^{20.5}$	39
4.5.	Sequenciação dos genes <i>HBB</i> e <i>HBA2</i>	39
4.6.	Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas em relação às alterações encontradas.....	41
5.	Discussão	45
5.1.	Deleções identificadas por MLPA.....	45
5.2.	Relação Genótipo/Fenótipo.....	50
6.	Conclusão	53
7.	Referências Bibliográficas	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntese das várias cadeias globínicas na vida pré e pós-natal.....	2
Figura 2. Localização do <i>cluster</i> α e β nos respetivos cromossomas.....	3
Figura 3. Esquema que mostra as várias combinações de cadeias globínicas encontradas no embrião, no feto e no adulto, juntamente com os <i>clusters</i> de genes que regulam a sua produção nos cromossomas 11 e 16.	4
Figura 4. Deleções mais frequentes que causam talassémia α^+ . X, Y e Z são as unidades homólogas de duplicação.	9
Figura 5. Deleções de ambos os genes α , que originam talassémia α^0	11
Figura 6. (a) Continuação da figura 5. (b) Deleções da região reguladora do <i>cluster</i> α , que deixam os genes α intactos.	11
Figura 7. Inclusões de Hb H num esfregaço corado com azul brilhante de cresil.....	12
Figura 8. Eletroferograma de uma amostra que contém Hb H.	13
Figura 9. Reação de MLPA incluindo 4 dos 5 passos principais	16
Figura 10. Representação esquemática do <i>cluster</i> α -globínico.	20
Figura 11. Representação esquemática da posição relativa de cada sonda do kit P102-B1 HBB no <i>cluster</i> β -globínico.	22
Figura 12. Representação esquemática da posição relativa de cada sonda do kit P140-B3 HBA no <i>cluster</i> α -globínico..	22
Figura 13. GAP-PCR para deteção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$	25
Figura 14. GAP-PCR para deteção da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish.	26
Figura 15. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigotia (Tabela 1 – indivíduos A1, A2 e A3).....	27
Figura 16. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas para a deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigotia (Tabela 1 – indivíduos A4, A5 e A6).....	28
Figura 17. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas para a deleção $-\alpha^{4.2}$ em heterozigotia (Tabela 1 – indivíduo A7).....	29
Figura 18. MLPA <i>HBB</i> - Gráfico representativo do padrão do rácio das sondas para a deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish (Tabela 2 – indivíduos B1 a B6)..	29
Figura 19. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão rácio das sondas obtido para a deleção $--^{LSB}$, em heterozigotia (Tabela 1 – indivíduo A8).	30
Figura 20. MLPA <i>HBA</i> - Padrão do rácio das sondas obtido para os indivíduos A9, A10 e A11 (Tabela 1).	31

Figura 21. MLPA <i>HBA</i> - Padrão do rácio das sondas obtido para o indivíduo A12 - Tabela 1.....	32
Figura 22. MLPA <i>HBA</i> - Respresentação do padrão do rácio das sondas da deleção que remove a região reguladora HS-40, na Família 1 (indivíduos A13 a A20) - Tabela 1.....	32
Figura 23. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção, em heterozigotia, dos indivíduos das Famílias 2 (A21 a A24) e 3 (A26 e A27) - Tabela 1.....	33
Figura 24. MLPA <i>HBA</i> - Padrão do rácio das sondas obtido para os indivíduos da Família 4 (A28 e A29) e indivíduo A30 - Tabela 1.....	34
Figura 25. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção que remove a região reguladora HS-40 do indivíduo A31 - Tabela 1.	34
Figura 26. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção que remove a região reguladora HS-40 do indivíduo A32 - Tabela 1.	35
Figura 27. MLPA <i>HBA</i> - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção que remove a região reguladora HS-40 do indivíduo A33 - Tabela 1.	36
Figura 28. MLPA <i>HBA</i> - Padrão do rácio das sondas obtido para o indivíduo A34 (Tabela 2) - deleção, em heterozigotia, que aparenta remover todo o <i>cluster</i> alfa.....	37
Figura 29. MLPA <i>HBB</i> - Padrão do rácio das sondas obtido para o indivíduo B7 (Tabela 2) - deleção, em heterozigotia, que aparenta remover todo o <i>cluster</i> beta.....	37
Figura 30. Esquema do <i>cluster</i> α -globínico.....	38
Figura 31. Esquema do <i>cluster</i> β -globínico.....	38
Figura 32. Resultados da técnica de hibridização reversa para (A) os indivíduos A9, A10 e A11 e (B) o indivíduo A12.....	39
Figura 33. Sequenciação do gene <i>HBA2</i> dos indivíduos A28, A29 e A30.....	40
Figura 34. Sequenciação do gene <i>HBB</i> do indivíduo A6.	40
Figura 35. Árvore genealógica da Família 1.	50
Figura 36. Árvore genealógica das Família 2 e 3.....	51
Figura 37. Árvore genealógica da Família 4.	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos que apresentam deleções no <i>cluster</i> α	42
Tabela 2. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos que apresentam deleções no <i>cluster</i> β	43
Tabela 3. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos estudados que não apresentam deleções no <i>cluster</i> β nem no <i>cluster</i> α	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CBC (*complete blood count*) – hemograma
DNA (*deoxyribonucleic acid*) – ácido desoxirribonucleico
Hb (*hemoglobin*) – hemoglobina
HPLC (*high performance liquid chromatography*)
HS (*erythroid-specific DNase I hypersensitive site*)
HVR (*hyper-variable region*) - região hipervariável
IVS (*intervening sequence*)
Kb (kilobases)
LCR (*locus control region*)
MCH (*mean cell hemoglobin*) – hemoglobina globular média
MCS (*multispecies conserved sequences*)
MCV (*mean cell volume*) – volume globular médio
MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)
MRE (*major regulatory element*)
mRNA (*messenger ribonucleic acid*) – ácido ribonucleico mensageiro
NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*)
nt (nucleótidos)
pb (pares de bases)
PCR (*polymerase chain reaction*)
UTR (*untranslated region*) – região não-codificante

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

As anemias hipocrômicas e microcíticas, não sideropénicas, são, na grande maioria dos casos, devidas a Talassémia. A beta-talassémia caracteriza-se por apresentar um doseamento de Hb A₂ superior ao normal (>3.0%). Se o estudo de hemoglobinas revela um valor de HbA₂ normal podemos estar perante uma alfa-talassémia, uma beta-talassémia com delta-talassémia ou variante delta associada ou, então, perante uma grande deleção no *cluster* β .

A pesquisa de grandes deleções nos *clusters* α e β -globínicos foi, durante muitos anos, realizada por *Southern-blotting*, uma metodologia complexa e pouco acessível, ficando a grande maioria dos casos por caracterizar.

A aplicação da metodologia de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) à pesquisa de deleções nos *clusters* dos genes globínicos alfa (*HBA*) e beta (*HBB*) permitiu que, nos últimos anos, tenham sido descritas várias deleções em todo o mundo. A utilização desta metodologia no nosso laboratório permitiu a identificação de deleções que estavam por caracterizar. Algumas destas deleções já se encontravam descritas na literatura. Para as não descritas, surgiu a necessidade de esclarecer a sua natureza, nomeadamente no que respeita à sua identificação, localização e limites.

1.2. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma metalo-proteína presente nos glóbulos vermelhos de todos os vertebrados, responsável pelo transporte de oxigénio e dióxido de carbono no sangue. Foi descoberta pela primeira vez, em 1840, por Hünefeld, investigador alemão da Universidade de Leipzig (1). É constituída por dois pares de cadeias globínicas, cada cadeia contendo um grupo heme com um único local de ligação ao oxigénio (1,2). Durante o desenvolvimento humano normal, formam-se sete hemoglobinas diferentes, de acordo com as necessidades de oxigénio dos vários ambientes específicos. Todos os tipos de Hb são tetrâmeros constituídos por duas cadeias globínicas α -like e β -like, cada uma das quais ligada a um grupo heme (3,4). Quatro são hemoglobinas embrionárias transitórias: Gower-1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Gower-2 ($\alpha_2 \epsilon_2$), Portland-1 ($\zeta_2 \gamma_2$) e Portland-2 ($\zeta_2 \beta_2$), produzidas no saco vitelino entre a 3^a e 8^a semanas de gestação (Figura 1).

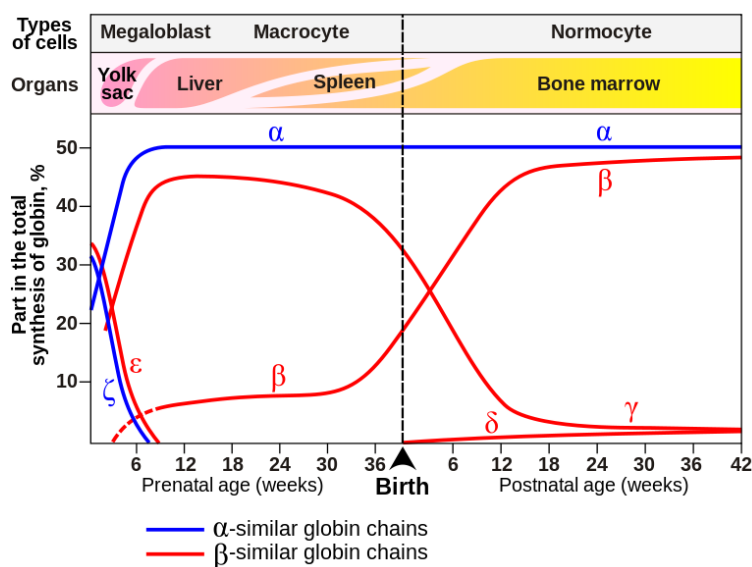


Figura 1. Síntese das várias cadeias globínicas na vida pré e pós-natal. (adaptado de Hoffband, Pettit and Moss, 2006 (2))

A Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$ e $\alpha_2 \delta_2$) constitui a maior percentagem da hemoglobina fetal total e é produzida entre a 8^a e 28^a semanas de gestação, quando o fígado assume o papel de principal órgão hematopoiético. Esta é a principal forma de hemoglobina presente pela altura do nascimento. A síntese de Hb A ($\alpha_2 \beta_2$) inicia-se durante o segundo trimestre da vida fetal e os seus níveis vão aumentando lentamente (2,4). Após o nascimento, e até ao 6^o mês de vida, ocorre a substituição gradual das cadeias γ por cadeias β e a formação da Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$). Num indivíduo adulto normal 95% da hemoglobina total é Hb A, sendo a restante constituída por 2 a 3% de Hb A₂ e 1 a 2% de Hb F.

1.3. Clusters α e β globínicos

1.3.1. Estrutura e Localização

Os *clusters* α e β globínicos são complexos multigénicos onde estão englobados os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas. Em cada *cluster* os genes estruturais estão dispostos ao longo do respetivo cromossoma de acordo com a ordem em que são expressos durante o desenvolvimento humano (5) (Figura 2).

O *cluster* β localiza-se no braço curto do cromossoma 11 (11p15.4) e inclui o gene embrionário ϵ , os genes da hemoglobina fetal γ e δ , o pseudogene $\psi\beta$ e os genes β e δ -globínicos (6,7). As regiões codificantes dos genes β -like são muito homólogas e consistem de 3 exões separados por dois intrões (*intervening sequences* - IVS) (8). Os

dois genes γ são altamente homólogos e codificam cadeias que diferem entre si em apenas um aminoácido na posição 136 (a cadeia $^G\gamma$ apresenta uma glicina, a cadeia $^A\gamma$ uma alanina). As cadeias δ e β são, também, similares diferindo em apenas 10 aminoácidos.

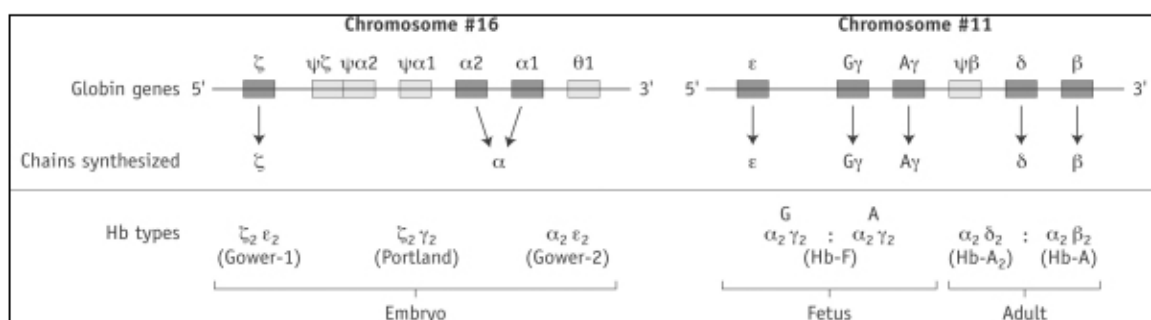


Figura 2. Localização do *cluster* α e β nos respectivos cromossomos. As caixas mais escuras representam os genes ativos. (adaptado de Wild and Bain, 2009 (3))

O *cluster* α situa-se na região telomérica do braço curto do cromossoma 16 (16p13.3) e inclui o gene embrionário ζ , dois genes menores α -like (μ e θ_1), três pseudogenes ($\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$ e $\psi\zeta$) e os dois genes α (α_1 e α_2) (6). Todos os genes α -like são constituídos por 3 exões separados por dois intrões e têm um elevado conteúdo de guaninas e citosinas. Os genes α_1 e α_2 são altamente homólogos, codificando proteínas iguais e diferindo apenas no intrão II (IVSII) e na região 3'-UTR (9)(10).

1.3.2. Regiões Reguladoras

O complexo padrão de expressão dos genes dos *clusters* α e β é regulado por sequências *cis-acting* proximais, tais como as regiões promotoras, e por sequências *cis-acting* distais, tais como a *locus control region* (LCR) no *cluster* β e o *major regulatory element* (MRE) no *cluster* α (6). A detecção de deleções raras nas sequências *cis-acting* distais veio demonstrar que a expressão dos genes β e α está extremamente dependente destas sequências reguladoras, também denominadas *erythroid-specific DNase I hypersensitive sites* (HS) (5,11).

O β -LCR é constituído por cinco locais HS (denominados HS-1 a 5) que se encontram distribuídos entre 6 e 20 Kb a montante do gene ϵ . Existe, ainda, um HS adicional a cerca de 20 Kb a jusante do gene β . Estes dois locais HS flanqueiam o complexo β , sugerindo

que delimitam as fronteiras do domínio do gene β (8,12). Estudos em que foram utilizados diferentes fragmentos do LCR, sozinhos ou em combinação, demonstraram que o HS-2 e o HS-3 são responsáveis, cada um, por cerca de 40 a 50% da actividade potenciadora desta região (13,14). O LCR parece afetar a organização da cromatina do *cluster* β (15) e regular a transcrição sequencial dos genes individuais durante a ontogénese (16).

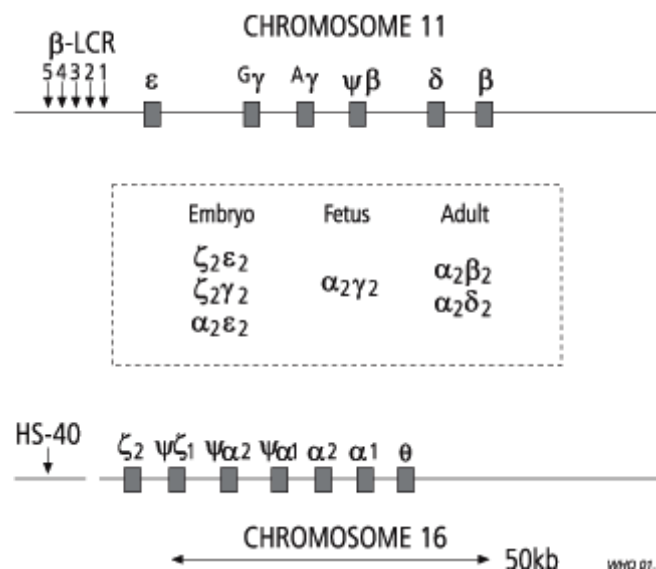


Figura 3. Esquema que mostra as várias combinações de cadeias globínicas encontradas no embrião, no feto e no adulto, juntamente com os *clusters* de genes que regulam a sua produção nos cromossomas 11 e 16. O β -LCR e o HS-40 são as principais regiões reguladoras destes *clusters*. (adaptado de Weatherall et al, 2001 (17))

A região reguladora do *cluster* α (MRE), localizada entre 40 e 50 Kb a montante dos genes α é constituída por quatro *multispecies conserved sequences* (MCS-R1 a R4), correspondentes a HS-48, HS-40, HS-33 e HS-10, de acordo com a distância (em Kb) em relação ao gene ζ . Estudos indicam que o MCS-R2 (HS-40), localizado a 40 Kb a montante do gene ζ , é o elemento mais importante para a regulação da expressão dos genes α . A deleção da região HS-40 no *cluster* α conduz a uma redução para valores inferiores a 5% do normal da expressão desses genes (18,19).

1.4. Hemoglobinopatias

Na população humana, cerca de 7% dos indivíduos são portadores de Hemoglobinopatias, um dos distúrbios monogénicos mais comuns e um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. O termo "hemoglobinopatia" engloba todas as patologias genéticas da hemoglobina. Estas dividem-se em dois grandes grupos: os síndromes talassémicas ou talassémias (resultam de alterações que provocam a redução

da síntese de uma ou mais cadeias globínicas) e as variantes estruturais da hemoglobina (resultam de alterações conducentes à produção de uma proteína de estrutura diferente) (20,21).

1.4.1. Talassémias

O termo “talassémia” deriva de duas palavras gregas: *thalassa* (mar) e *haima* (sangue). Trata-se de um grupo de patologias da hemoglobina, que se caracteriza por uma diminuição, ou ausência completa, da síntese das cadeias globínicas. As formas suaves são de transmissão autossômica dominante; as formas severas apresentam transmissão autossômica recessiva. De entre os vários tipos de talassémia, as α e as β -talassémias são as que possuem maior relevância clínica, não só pela sua elevada prevalência a nível mundial, mas também pela severidade dos fenótipos produzidos.

Podem resultar tanto de mutações pontuais, como de pequenas ou grandes deleções/inserções nos genes das cadeias globínicas.

1.4.1.1. Beta-Talassémia

A maioria das β -talassémias ocorre devido a mutações pontuais ou pequenas deleções ou inserções no gene *HBB*. Alguns casos raros são devidos a grandes deleções no *cluster* β , como é o caso das $\delta\beta$ -talassémias, das $\gamma\delta\beta$ -talassémias e das deleções no LCR. As mutações que conduzem a uma ausência completa da síntese de cadeias β são designadas mutações β^0 , as que conduzem a uma redução na sua síntese são denominadas β^+ . Existe, ainda, um tipo de mutações, muito suaves - mutações β^{++} - que originam reduções muito ligeiras na síntese destas cadeias (20,22).

- Beta-Talassémia minor

Os indivíduos heterozigóticos para mutações β^0 ou β^+ apresentam um quadro hematológico de anemia ligeira hipocrômica (MCH < 27pg) e microcítica (MCV < 80fL). O estudo de hemoglobinas revela um aumento dos níveis de Hb A₂ (3,5 a 6%) com níveis normais ou ligeiramente aumentados de Hb F (0,5 a 3%). Estes indivíduos possuem um fenótipo de β -talassémia minor.

Os indivíduos heterozigóticos para mutações β^{++} apresentam β -talassémia silenciosa, com parametros hematológicos e doseamentos de HbA₂ no limite inferior da normalidade.

A homozigotia e a heterozigotia composta para mutações no gene *HBB* dão origem aos fenótipos de β -talassémia intermédia (β^+ / β^+ , β^0 / β^+ , β^0 / β^{++}) ou de β -talassémia major (β^0 / β^0).

- Beta-Talassémia intermédia

A β -talassémia intermédia engloba um vasto espectro de fenótipos clínicos que se localizam entre os de talassémia minor e os de talassémia major, ocorrendo uma considerável sobreposição entre as três entidades. Rietti-Greppi-Micheli, em 1955, descreveu os doentes com talassémia intermédia como sendo “demasiado severos para serem considerados minor, mas muito suaves para serem considerados major” (23). Em geral, todos os doentes apresentam valores de Hb inferiores aos verificados na β -talassémia minor, reticulocitose e baço palpável, não sendo dependentes de transfusões.

Os doentes com fenótipo mais suave podem permanecer assintomáticos até à idade adulta, experienciando apenas anemia ligeira com níveis de Hb entre 7 e 10 g/dL. Os doentes com formas mais graves de talassémia intermédia são, geralmente, diagnosticados entre os 2 e os 6 anos de idade e, apesar de poderem sobreviver sem qualquer terapêutica transfusional, podem apresentar algum atraso no crescimento e desenvolvimento se não forem devidamente acompanhados (23,24). Os seus níveis de Hb raramente sobem acima dos 6 g/dL (sem transfusão) e podem apresentar deformidades esqueléticas, úlceras crónicas dos membros inferiores e esplenomegália.

A β -talassémia intermédia tem transmissão autossómica recessiva, com ressalva para uma forma incomum de β -talassémia intermédia de transmissão dominante, associada a mutações (pontuais ou pequenas deleções/inserções) no terceiro exão do gene *HBB*. Estas mutações são, normalmente, do tipo *non-sense*, *frameshifts*, e rearranjos complexos, que conduzem à produção de cadeias β truncadas ou alongadas, mas altamente instáveis. Estas cadeias não são viáveis e são rapidamente destruídas saturando os mecanismos proteolíticos dos precursores eritróides. A sua consequente precipitação contribui para a eritropoiese ineficaz e é responsável pelo padrão de transmissão dominante deste tipo de talassémia (25). De acordo com alguns estudos efetuados em modelos celulares o mRNA que transporta a codões de terminação prematuros escapa ao mecanismo de vigilância denominado *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), cuja função principal é bloquear a síntese de proteínas truncadas que podem ter efeitos negativos na função celular (26–28).

- Beta-Talassémia major

A β -talassémia major é a forma mais grave da doença, manifestando-se nos primeiros meses de vida. Como não há síntese de cadeias β não há formação de Hb A, estando presente apenas Hb F, e alguma Hb A₂. A anemia é severa, hipocrômica e microcítica, com uma anisopoiquilocitose marcada, células fragmentadas, pontuado basófilo e eritroblastos no sangue periférico. As cadeias α desemparelhadas não são capazes de formar tetrâmeros viáveis e precipitam dentro dos precursores eritróides. As inclusões resultantes são responsáveis pela destruição intramedular destes precursores e, portanto, pela eritropoiese ineficaz (29).

Os doentes com β -talassémia major precisam de ser regularmente transfundidos para manter os níveis de Hb adequados, bem como para diminuir a eritropoiese anormal e o excesso de cadeias α produzido. Para prevenir a sobrecarga de ferro resultante da alta taxa de absorção intestinal e do aporte dado pelas transfusões é implementada uma terapia de quelação do ferro. Sem transfusões regulares, as complicações da anemia severa conduzem a uma morte prematura antes dos 3-4 anos de idade.

Algumas das manifestações clínicas incluem a hepatoesplenomegália, o hiperesplenismo (que leva a trombocitopenia, leucopenia e rápida destruição dos eritrócitos) expansão massiva da medula e a sobrecarga de ferro (provoca danos no miocárdio, fígado, pâncreas e outros órgãos).

1.4.1.2. $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ e $\epsilon\gamma\delta\beta$ -Talassémias

As $\delta\beta$ -talassémias resultam de deleções de diferentes tamanhos no *cluster* β , englobando os genes δ e β . Caracterizam-se por hipocromia e microcitose com produção aumentada de Hb F mesmo na idade adulta (entre 4 e 18,6%) (30), desequilíbrio do rácio das cadeias α /não α e valores normais de Hb A₂. Estão descritos vários tipos de deleções relacionadas com os diferentes grupos étnicos que incluem a $\delta\beta$ -tal Spanish, a Hb Lepore, a $\delta\beta$ -tal Turkish, German, Japanese, Black, Sicilian, entre outras (30,31). A $\delta\beta$ -tal Spanish e a Hb Lepore compreendem duas das $\delta\beta$ -talassémias mais comuns na Península Ibérica.

As $\gamma\delta\beta$ e $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémias resultam de deleções mais extensas no *cluster* β . Ambas apresentam desequilíbrio do rácio das cadeias α /não α .

As $\gamma\delta\beta$ -talassémias caracterizam-se por hipocromia e microcitose, com níveis normais de Hb A₂ e níveis normais ou aumentados de Hb F, consoante são eliminados ambos os genes *HBB* ou apenas um deles, respetivamente.

As $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémias podem ser devidas a deleções que abrangem todo o cluster β , incluindo o gene *HBB*, ou à presença de deleções na região reguladora do cluster β (LCR) que conduz ao bloqueio da expressão dos genes do cluster β . Estas alterações só foram observadas em heterozigotia. A homozigotia nunca foi detetada presumivelmente por ser incompatível com a vida (32). As manifestações clínicas incluem anemia neonatal sendo por vezes necessárias transfusões ainda *in utero* ou durante o período neonatal. A anemia resolve nos primeiros meses de vida e o fenótipo do adulto é similar ao de uma β -talassémia menor possuindo, no entanto, Hb A₂ normal.

1.4.1.3. Alfa-Talassémia

O termo α -talassémia engloba as condições em que há um défice na produção de cadeias α . A sub-produção de cadeias α origina um excesso relativo de cadeias β -like que se podem unir e formar tetrâmeros (33).

A presença de dois genes α funcionantes (*HBA2* e *HBA1*) em cada cromossoma 16 de um indivíduo normal, confere-lhe um genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. A α -talassémia resulta, maioritariamente, de deleções de um ($-\alpha$) ou dos dois ($--$) genes de um cromossoma. Ocasionalmente, podem ocorrer mutações pontuais em regiões críticas do gene *HBA2* ($\alpha^T\alpha$) ou do gene *HBA1* ($\alpha\alpha^T$), originando α -talassémia não-delecional. Muito raramente, a α -talassémia pode resultar de deleções nos elementos reguladores MCS-R ($(\alpha\alpha)^T$) (33,34).

Quando uma mutação abole completamente a expressão dos genes α de um dos cromossomas 16, a talassémia resultante denomina-se talassémia α^0 . Quando a mutação apenas suprime parcialmente a expressão desses genes, denomina-se talassémia α^+ .

- Talassémia α^+ devido a deleções $-\alpha/$

Os portadores de α talassémia com 3 genes α funcionais, são assintomáticos apresentando valores normais de hemoglobina com valores de MCV e MCH nos limites inferiores da normalidade. O estudo de hemoglobinas revela níveis de Hb A₂ e Hb F normais.

A deleção mais comum associada com o fenótipo α^+ -tal é a deleção de 3.7 Kb provocada por uma recombinação recíproca entre segmentos Z (Figura 4). Desta recombinação resulta um cromossoma com apenas um gene funcional ($-\alpha^{3.7}$, também denominada deleção à direita), e um alelo de triplicação α . Recombinações não homologas entre caixas X desemparelhadas resultam numa deleção de 4.2 Kb ($-\alpha^{4.2}$, também designada deleção à esquerda) (Figura 4) (33,35,36).

- Talassémia α^+ devido a eventos não-delecionais $\alpha^T\alpha$ e $\alpha\alpha^T$

Embora a talassémia seja mais frequentemente devida a deleções, têm sido descritas mutações pontuais que afetam o processamento do mRNA, a tradução do mRNA e a estabilidade das cadeias globínicas α . As mutações mais comuns incluem a $\alpha^{IVSI(-5nt)}\alpha$ (na população mediterrânica), as mutações no local de poliadenilação (na população mediterrânica e do médio-orientes), mutações no codão de terminação que originam proteínas alongadas, como a Hb Constant Spring (comuns no médio-orientes, mediterrâneo e sudoeste da Ásia) (37) e mutações estruturais que geram cadeias α altamente instáveis, como a Hb Quong Sze (38).

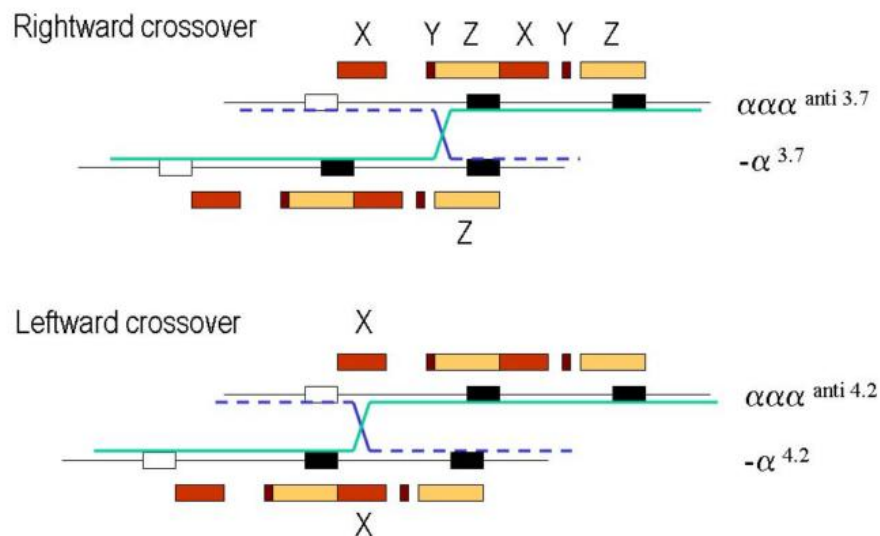


Figura 4. Deleções mais frequentes que causam talassémia α^+ . X, Y e Z são as unidades homólogas de duplicação. Durante a meiose, o *crossing-over* entre caixas Z desemparelhadas origina os alelos $-\alpha^{3.7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{3.7}$. O *crossing-over* entre caixas X desemparelhadas origina os alelos $-\alpha^{4.2}$ e $\alpha\alpha\alpha^{4.2}$. (adaptado de Hartevelde et al, 2010 (33))

Geralmente, os eventos não-delecionais da talassémia α^+ dão origem a uma redução mais severa da síntese das cadeias α , do que os eventos delecionais do tipo $-\alpha$ (33).

- Talassémia α^0 devido a deleções $--/$ e $(\alpha\alpha)^T$

A deleção parcial ou completa de ambos os genes α em *cis* leva à perda total da síntese de cadeias α , no cromossoma afetado. Os portadores, com genótipo $--/\alpha\alpha$ apresentam anemia ligeira, hipocromia e microcitose significativas e uma redução do rácio da síntese de cadeias α/β , para 0,5-0,7 (normal 0,9-1,1) (36). Os adultos podem apresentar alguma Hb H (β_4) e os recém-nascidos 3 a 8% de Hb Bart's (γ_4), que desaparece antes dos seis meses de vida (35).

Nas Figuras 5 e 6a encontram-se resumidas algumas das deleções do tipo $--/$. A homozigotia para estas deleções causa hidrúpsia fetal por Hb Bart's (*Hb Bart's Hydrops Foetalis*, uma condição incompatível com a vida. As deleções mais comuns são a $--^{SEA}$, no Sudoeste Asiático, e as deleções $--^{MED}$ e $-\alpha^{20.5}$, na região do Mediterrâneo.

Algumas deleções raras, $(\alpha\alpha)^T$, que causam talassémia α^0 removem a região reguladora do *cluster* α , deixando os genes α intactos, mas inativando completamente a sua expressão. Dos elementos reguladores presentes nesta região, apenas o MCS-R2 (HS-40) parece ser essencial para a expressão dos genes α (5–7,11,18,39,40). Na Figura 6b estão representadas algumas das deleções conhecidas da região reguladora do *cluster* α .

Grandes deleções (1-2 megabases) da extremidade do cromossoma 16, incluindo o *cluster* α , estão associadas a talassémia α^0 e atraso mental, sendo denominadas ATR-16 (41).

- Doença da Hb H

A doença da Hb H resulta da perda ou inativação de 3 dos 4 genes α , produzindo um genótipo $--/-\alpha$. As cadeias β em excesso associam-se em tetrâmeros constituindo a Hb H (β_4). Os indivíduos afetados apresentam manifestações clínicas associadas a anemia hemolítica crónica de severidade variável, nomeadamente esplenomegália que, ocasionalmente, é complicada por hiperesplenismo. A maioria dos doentes apresenta anemia severa a moderada com valores de Hb entre os 2,6 e os 13,3 g/dL (33), reticulocitose moderada, hipocromia, microcitose e células em alvo, células em lágrima e pontuado basófilo no sangue periférico. As inclusões de Hb H podem ser observadas na maioria dos eritrócitos após coloração supra-vital (com azul de metileno novo ou azul brilhante de cresil) (Figura 7) (42). Estas inclusões formam-se por precipitação da Hb H (instável) na membrana do eritrócito, dando-lhe um aspecto de "bolas de golf".

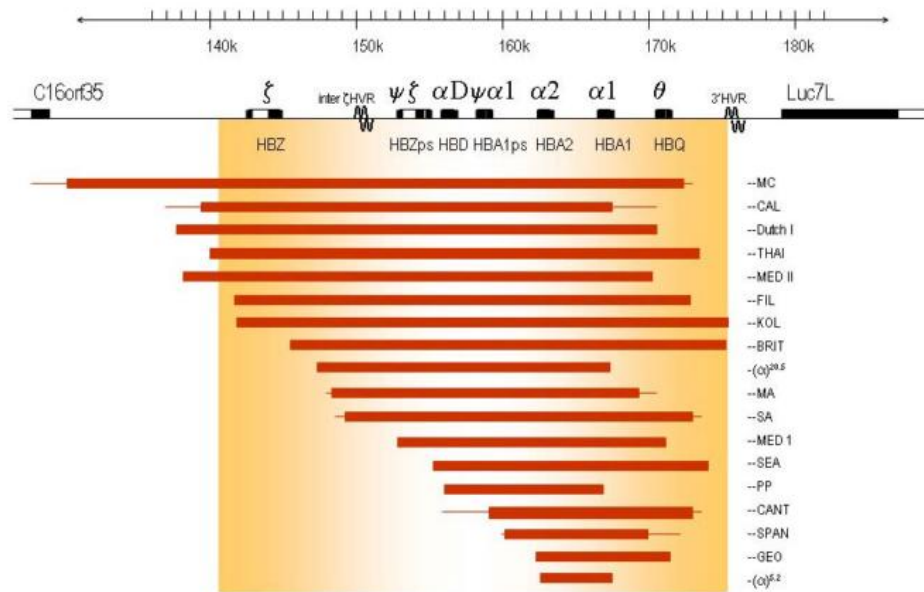


Figura 5. Deleções de ambos os genes α , que originam talassêmia α^0 . (adaptado de Hartevelde et al, 2010 (33))

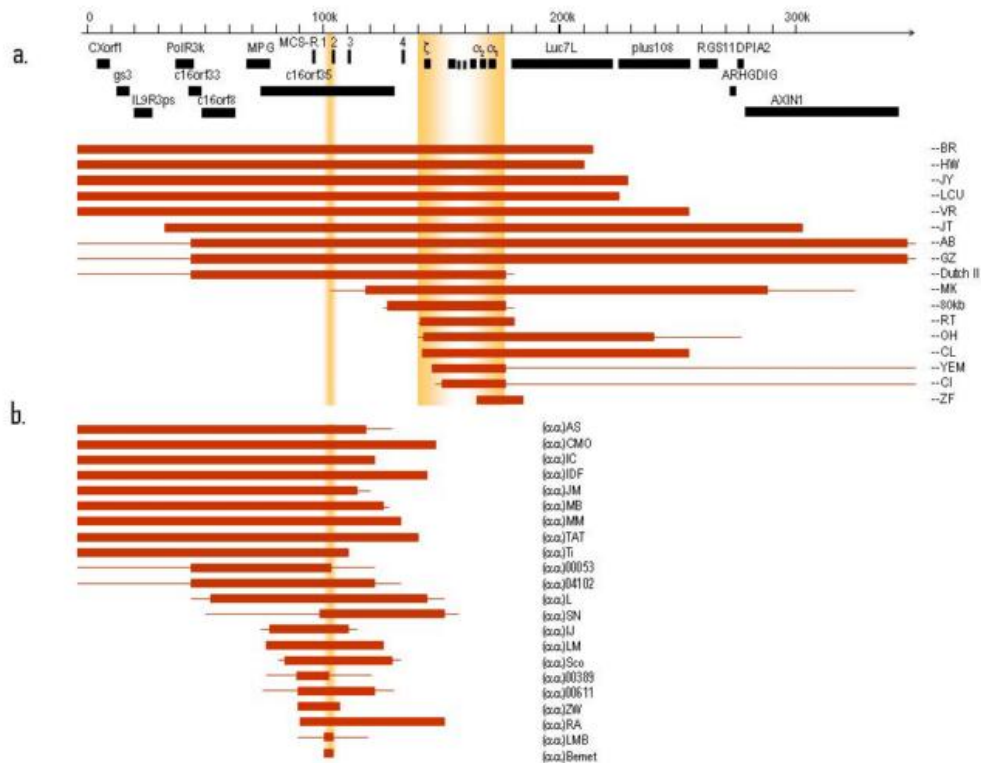


Figura 6. (a) Continuação da figura 5. (b) Deleções da região reguladora do *cluster* α , que deixam os genes α intactos. (adaptado de Hartevelde et al, 2010 (33))

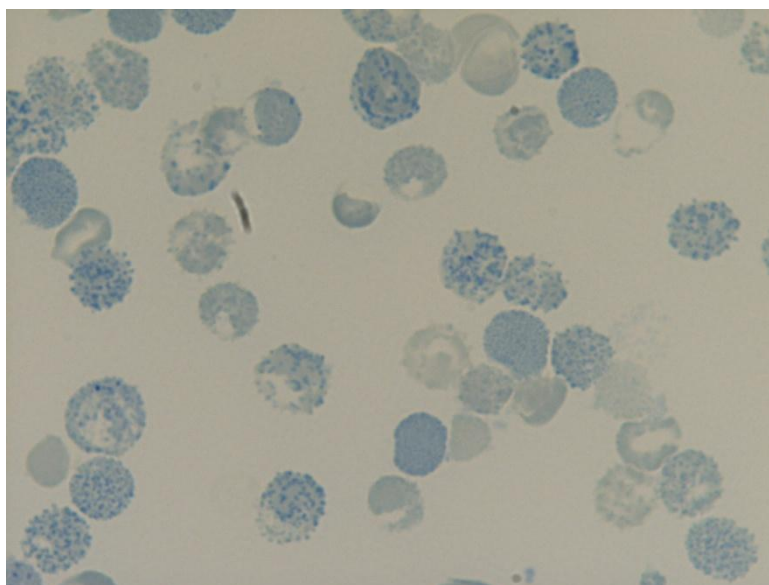


Figura 7. Inclusões de Hb H num esfregaço corado com azul brilhante de cresil.

A Hb H também pode ser detetada por HPLC (Figura 8), surgindo como um pico por volta dos 20 segundos no eletroferograma. Apesar de ser visível não é identificada pois elui fora da janela de deteção do equipamento.

A anemia, nos doentes com Hb H, torna-se mais severa durante a gravidez, infeções e após a ingestão de fármacos oxidantes, que aumentam a oxidação e precipitação da mesma. Os recém-nascidos apresentam Hb Bart's (γ_4) que varia entre os 15 e os 30%, sendo gradualmente substituída pela Hb H (0.8-40%).

- Hb Bart's *Hydrops Foetalis*

A Hb Bart's *Hydrops Foetalis* resulta da deleção ou inativação dos 4 genes α (--/--) e é incompatível com a vida. Devido à ausência de síntese de cadeias α , o feto não produz Hb F nem Hb A (34). Até à 8ª semana de gestação estão presentes as hemoglobinas embrionárias (Gower 1 e 2, e Portland). Quando ocorre o switch para a hemoglobina fetal, dada a incapacidade de produzir cadeias α , a Hb Bart's torna-se a hemoglobina dominante. Sendo uma Hb instável e com uma elevada afinidade para o oxigénio, não é funcional (43) e os fetos quase sempre morrem *in utero* (23-38 semanas) ou pouco depois do nascimento (33) como consequência da hipóxia tecidual, anemia severa, insuficiência cardíaca, hematopoiese extramedular, edemas generalizados, hepatoesplenomegália e complicações placentares (44). O esfregaço de sangue periférico apresenta eritroblastose severa, anisopoiquilocitose, macrócitos grandes e hipocrómicos, e policromasia.

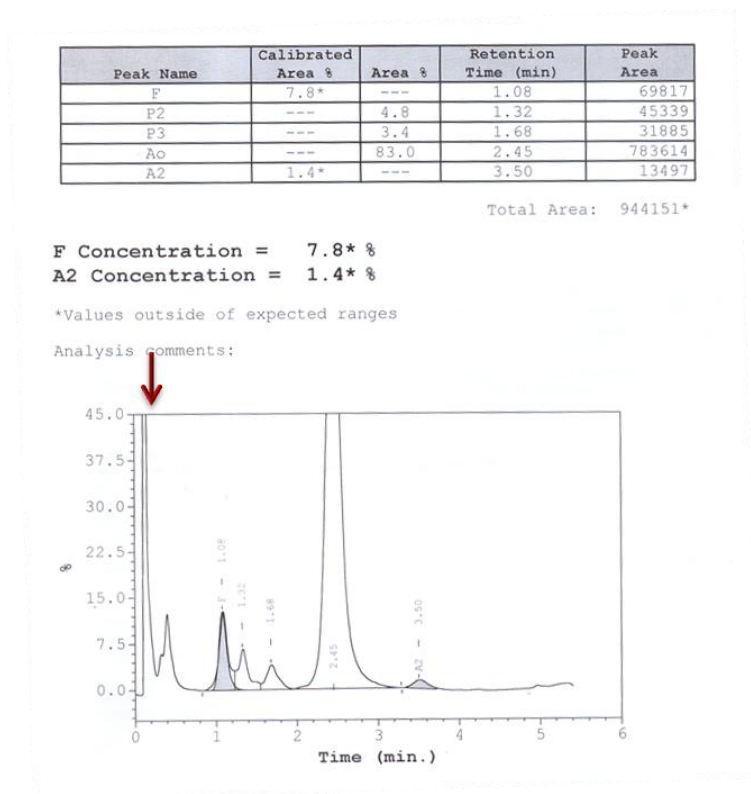


Figura 8. Eletroferograma de uma amostra que contém Hb H.

1.4.2. Variantes estruturais de Hemoglobina

As variantes de hemoglobina resultam normalmente de mutações pontuais, que conduzem a alterações na sequência de aminoácidos das cadeias α e β globínicas (45,46). O fenótipo resultante depende do tipo de mutação e da localização do aminoácido alterado na proteína. As variantes de Hb podem ser classificadas em 4 grupos: as variantes não talassémias e as variantes talassémicas (de transmissão autossômica recessiva); as variantes com afinidade alterada para o oxigênio e as variantes instáveis (de transmissão autossômica dominante).

1.4.2.1. Variantes não talassémicas

São exemplos de hemoglobinas não talassémicas a Hb S (*HBB*: c.20A>T; p.Glu7Val), a Hb C (*HBB*: c.19G>A; p.Glu7Lys), e a Hb D-Punjab (*HBB*: c.364G>C; p.Glu122Gln), entre outras. Os portadores destas variantes não apresentam qualquer alteração clínica para além da presença de uma banda característica no HPLC ou eletroforese de Hbs. Os

heterozigóticos ou compostos heterozigóticos apresentam fenótipo variável que vai desde severo (SS, SC, SD) a suave (CC) ou nulo (DD).

A Hb S é a variante de hemoglobina mais comum nos indivíduos de origem africana, sendo de grande interesse clínico porque os homozigóticos apresentam drepanocitose, uma patologia que cursa com anemia hemolítica crônica e episódios vaso-oclusivos dolorosos, derivados da polimerização da Hb S sob baixas tensões de oxigênio, que distorce a membrana do eritrócito de uma forma irreversível. Os doentes com drepanocitose (SS, SD, SC, S β -tal) possuem um comprometimento do crescimento, bem como uma suscetibilidade aumentada a infecções, devendo iniciar desde muito cedo profilaxia antibiótica adequada.

1.4.2.2. Variantes talassémicas

As variantes talassémicas, como o nome sugere, cursam com anemia hipocrômica e microcítica. Algumas variante são detetadas por eletroforese das Hbs ou HPLC, como a Hb E (*HBB*: c.79G>A; p.Glu27Lys) e a Hb Lepore ($\delta\beta$ -talassémia). Outras são eletroforeticamente silenciosas, como a Hb Plasencia (*HBA2*: c.377T>G; p.Leu126Arg) (47) e a Hb Iberia (*HBA2*: c.313T>C; p.Cys105Arg) (48).

1.4.2.3. Variantes com afinidade alterada para o oxigênio

Algumas variantes de Hb apresentam um aumento da afinidade para o O₂ conduzindo à hipóxia tecidual, o que promove uma eritrocitose compensatória por aumento da produção de eritropoietina. Estas variantes não estão associadas a hemólise nem a uma morfologia anormal dos glóbulos vermelhos. Geralmente, existe história familiar associada, embora estejam descritos casos raros com aparecimento “*de novo*”. Estão descritas várias hemoglobinopatias relacionadas com um aumento da afinidade do O₂ em todo o mundo. Exemplos de variantes de alta afinidade são a Hb Coimbra (*HBB*: c.300T>A; p.Asp100Glu) (49) e a Hb Vila Real (*HBB*: c.110C>A; p.Pro37His) (50).

As variantes com uma afinidade reduzida ao oxigênio conduzem à cianose cutânea e das membranas mucosas.

1.4.2.4. Variantes instáveis

As variantes instáveis de Hb ocorrem devido a substituições de aminoácidos em regiões charneira da molécula de Hb, fundamentais para a sua estabilidade e integridade. As

variantes instáveis desnaturam e precipitam dentro do glóbulo vermelho. Os precipitados assim formados ligam-se à membrana da célula sob a forma de corpos de Heinz (51). Estas células são prematuramente destruídas pelo sistema reticulo-endotelial, o que diminui a sua semi-vida e origina um quadro de anemia hemolítica crônica. A severidade fenotípica depende do grau de instabilidade da Hb, podendo apresentar, ou não, pico da variante no HPLC. Um exemplo de uma variante instável que apresenta pico no HPLC é o da Hb Köln (*HBB*: c.295G>A; p.Val98Met).

1.5. Detecção de grandes deleções por MLPA

As grandes deleções nos *clusters* β e α não são detectáveis pelas técnicas convencionais de biologia molecular (PCR e sequenciação), sendo necessário recorrer à tecnologia de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

O MLPA consiste num PCR multiplex que utiliza até 40 sondas (cada uma específica para uma dada sequência de DNA no gene em estudo) e que permite a avaliação do número de cópias relativo de cada sequência de DNA. Cada sonda é constituída por uma sequência-alvo específica que se liga ao DNA em estudo, por uma sequência complementar ao *primer* universal, para permitir a amplificação simultânea de todas as sondas através de um PCR multiplex, e por uma sequência que possui comprimentos diferentes para cada sonda (*stuffer sequence*) e vai permitir fazer a distinção dos diferentes fragmentos na eletroforese capilar. As sondas estão inicialmente divididas em duas “meias-sondas” (terminais 5’ e 3’).

A metodologia de MLPA (Figura 9) pode ser dividida em 5 passos fundamentais:

1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas. Neste primeiro passo, o DNA é desnaturado pela temperatura e incubado com a mistura de meias-sondas, capazes de reconhecer sequências-alvo específicas contíguas.
2. Reação de ligação. Após a hibridização, e apenas na presença de uma correspondência perfeita entre as duas meias-sondas e a sequência-alvo, estas são unidas por ação de uma ligase.
3. Amplificação por PCR. O passo de PCR utiliza um par de *primers* universal, estando um dos *primers* marcado com um fluorocromo. Uma vez que apenas as meias-sondas unidas (sonda 5’ + sonda 3’) são amplificadas durante a reação de PCR, o número de fragmentos amplificados é uma medida do número de sequências-alvo presentes na amostra. Um ponto-chave do MLPA é que o PCR não amplifica as sequências-alvo, mas

sim as sondas ligadas onde está incorporada a sequência complementar ao *primer* universal, o que permite utilizar um único par de *primers* para a amplificação, ao contrário dos PCRs multiplex convencionais, que utilizam vários *primers*.

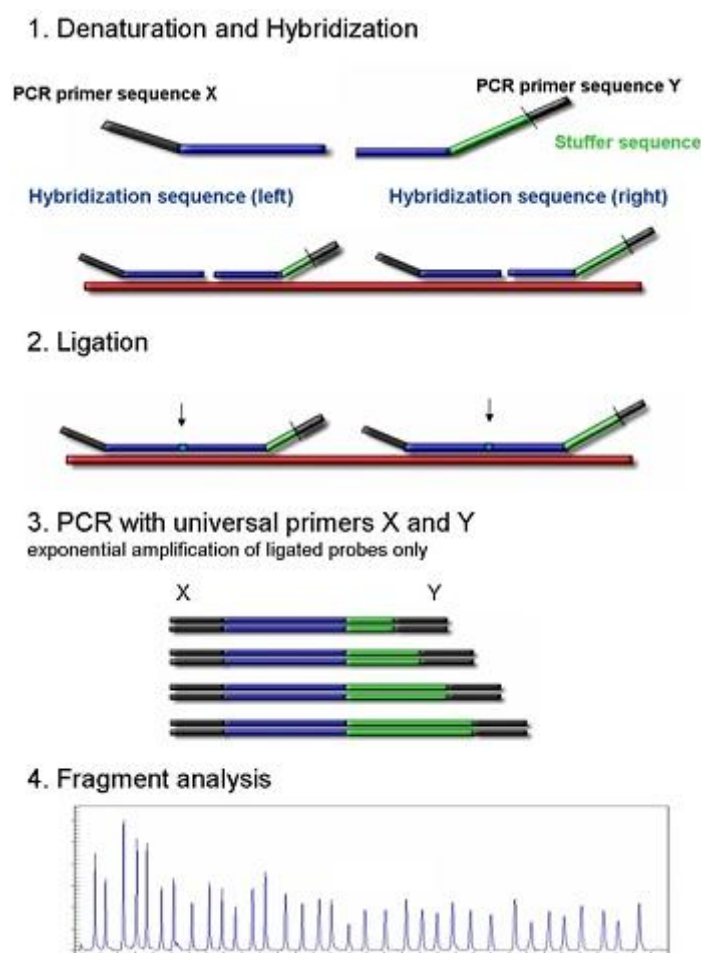


Figura 9. Reação de MLPA incluindo 4 dos 5 passos principais (Desnaturação e Hibridização, Ligação, PCR e Análise de fragmentos). (adaptado de www.mlpa.com)

4. Eletroforese capilar. Os produtos de PCR são, então, separados por eletroforese capilar, sob condições desnaturantes.

5. Análise dos dados. Após a eletroforese a altura ou a área dos picos de fluorescência é medida, quantificando os produtos de PCR, após normalização, e comparando-os com amostras de DNA controlo. O *software* mais amplamente utilizado para análise de MLPAs é o Coffalyser.NET™, um programa com base Excel que desempenha todos os passos de normalização e correção de sinal (52).

2. OBJETIVOS

Com o presente trabalho pretendeu-se investigar a presença de deleções nos *clusters* α e β -globínicos num grupo de indivíduos com anemia hipocrómica e microcítica, sem sideropénia, e doseamento de Hb A₂ normal. Para tal procedeu-se à implementação e otimização da técnica de MLPA.

Pretendeu-se, também, determinar a extensão das deleções encontradas e, se possível, determinar a localização dos *breakpoints* das mesmas.

A identificação de grandes deleções nos *clusters* α e β em indivíduos com formas raras de talassémia é crucial para compreender a fisiopatologia destas doenças, e também na elaboração de estratégias para diminuir a sua incidência, através de consultas de aconselhamento genético e, se necessário, o diagnóstico pré-natal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram estudados 58 indivíduos (28 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 3 e os 68 anos; 30 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 2 e os 78 anos) com hipocromia e microcitose sugestiva de talassémia. Destes, 40 eram casos esporádicos em que não foram feitos estudos familiares e os restantes 18 pertencem a 4 famílias: Família 1, originária de Ponta Delgada, com 8 indivíduos estudados; Família 2 com 5 indivíduos oriundos de Leiria; Família 3 com 2 indivíduos naturais de Pombal; Família 4 com 2 indivíduos de Ponta Delgada. Todos os indivíduos estudados deram o consentimento informado.

As amostras eram provenientes de doentes seguidos na consulta de Patologia do Glóbulo Vermelho do serviço de Hematologia do Hospital Pediátrico e do Hospital Geral ou foram enviadas para a Unidade de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do serviço de Hematologia do Hospital Pediátrico a partir de outros hospitais e laboratórios de Portugal e Espanha para esclarecimento do diagnóstico.

3.2. Hemograma e Estudo de Hemoglobinas

Os hemogramas foram efetuados no analisador automático CELL-DYN Sapphire analyzer (Abbot Diagnostics, Illinois, USA) em amostras de sangue total, colhidas em tubos de K₃EDTA.

O estudo de hemoglobinas foi realizado por cromatografia de troca catiónica de alta performance (HPLC) no equipamento VARIANT II™, utilizando o β -Thalassemia Short Program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Este equipamento, totalmente automático, permite efetuar a quantificação das hemoglobinas A₂ e F, bem como determinar qualitativa e quantitativamente a presença de variantes de Hb. As amostras são diluídas na estação de amostragem e posteriormente injetadas na coluna analítica. As bombas duplas da estação cromatográfica proporcionam à coluna um gradiente de tampão de crescente força iónica. No interior da coluna, as diferentes hemoglobinas são separadas com base nas suas interações iónicas com o material da coluna. Por fim, as hemoglobinas assim isoladas passam através da célula de leitura do fotómetro de filtros, que mede alterações de absorvância a 415nm. Um filtro adicional de 690nm é utilizado para corrigir a absorvância de fundo.

3.3. Estudos Moleculares

O DNA genómico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico através do kit de extração QIAamp® DNA Blood Mini (QIAGEN™, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.1. GAP-PCR para detecção das α -talassémias deletoriais mais frequentes ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$)

As α -talassémias deletoriais mais frequentes ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) foram pesquisadas, em todos os indivíduos com valores de Hb A₂ e Hb F normais, por uma reação de PCR multiplex (GAP-PCR) de acordo com Chong et al (53).

A amplificação do DNA genómico foi efetuada num volume total de 24 μ L, por amostra, contendo: 11,7 μ L de H₂O, 2,5 μ L de PCR buffer 10x (QIAGEN™), 5 μ L de Q-Solution (QIAGEN™), 0,5 μ L de solução de dNTPs [10 mM] (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,5 μ L de *Primer* $\alpha_2/3.7$ -F [100 ng/ μ L], 0,5 μ L de *Primer* 3.7/20.5-R [100 ng/ μ L], 0,5 μ L de *Primer* α_2 -R [100 ng/ μ L], 1,25 μ L de *Primer* 4.2-F [100 ng/ μ L], 1,25 μ L de *Primer* 4.2-R [100 ng/ μ L], 0,25 μ L de HotStarTaq® DNA Polymerase (QIAGEN™), e 0,5 μ L de DNA genómico. Na Figura 10 estão representadas as posições relativas (no *cluster* α -globínico) dos primers utilizados.

A reação de PCR foi efetuada num termociclador Biometra TPersonal (Biometra GmbH, Germany), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 96°C durante 15 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96°C durante 45 s, *annealing* a 60°C durante 90 s, e extensão a 72°C durante 135 s, um ciclo de extensão adicional a 72°C durante 5 min e um passo final de pausa a 4°C.

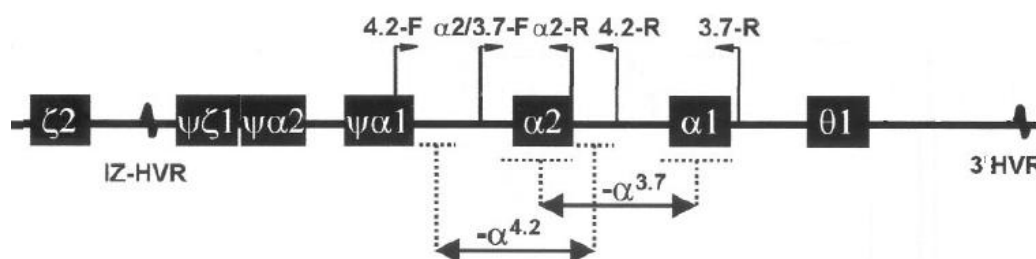


Figura 10. Representação esquemática do *cluster* α -globínico. Pode observar-se a extensão de cada deleção e a posição relativa dos primers utilizados no PCR multiplex. (adaptado de Chong et al, 2000 (53))

Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese num gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Interpretaram-se os resultados por comparação dos padrões de amplificação das amostras com os controlos.

3.3.2. GAP-PCR para detecção da deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish

A pesquisa da deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish foi efetuada em todos os indivíduos com valor de Hb A₂ normal e Hb F > 2%, por GAP-PCR, utilizando uma técnica adaptada de Vives-Corróns et al (54), com o Kit Multiplex (QIAGENTM).

A amplificação do DNA genómico foi efetuada num volume total de reação de 7,375 μ L, por amostra, contendo: 1 μ L dH₂O, 0,625 μ L de Q-Solution (QIAGENTM), 3,125 μ L de Multiplex Mix (QIAGENTM), 0,5 μ L de *Primer* N₁ [100 ng/ μ L], 0,5 μ L de *Primer* N₂ [100 ng/ μ L], 0,125 μ L de *Primer* Sp $\delta\beta$ [100 ng/ μ L], e 1,5 μ L de DNA genómico.

As condições de amplificação para a reação de PCR foram as seguintes: desnaturação a 95°C durante 15 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, *annealing* a 48°C durante 1 min, e extensão a 72°C durante 70 s. Seguiu-se um passo adicional de extensão a 72°C durante 10 min e um passo final de pausa a 4°C.

3.3.3. MLPA

Grandes deleções ou deleções menos comuns nos *clusters* β e α foram pesquisadas por MLPA através da utilização dos kits SALSA MLPA P102-B1 HBB and P140-B3 HBA (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), respetivamente, de acordo com o manual do fabricante.

A *probemix* do kit P102-B1 HBB contém 43 sondas. Destas, 28 encontram-se distribuídas na região do gene *HBB*, incluindo várias sondas nas regiões reguladoras a montante e uma sonda específica para a mutação responsável pela Hb S (Figura 11). As restantes sondas são sondas controlo desenhadas para determinar a quantidade de DNA na reação (fragmentos Q), a qualidade da desnaturação do DNA (fragmentos D) e para a determinação do sexo (fragmentos X e Y).

A *probemix* do kit P140-B3 HBA contém 38 sondas. Destas, 25 detetam variações do número de cópias em várias sequências na região dos genes *HBA*. Para além disso, esta *probemix* contém, ainda, uma sonda específica para a presença da mutação que origina a Hb Constant Spring (Figura 12). As restantes sondas, são sondas controlo, semelhantes às do kit HBB.

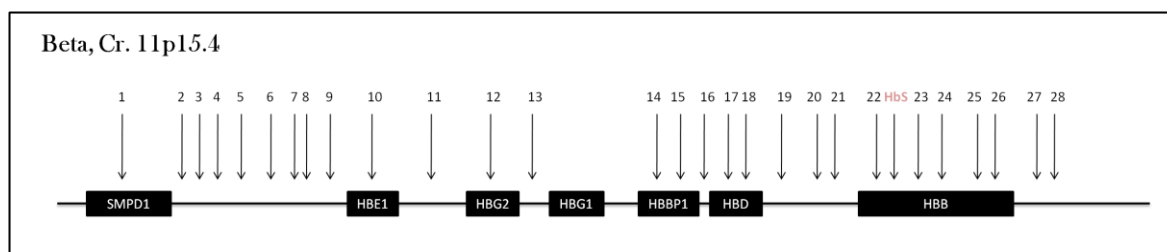


Figura 11. Representação esquemática da posição relativa de cada sonda do kit P102-B1 HBB no *cluster* β-globínico. O tamanho dos genes não está à escala.

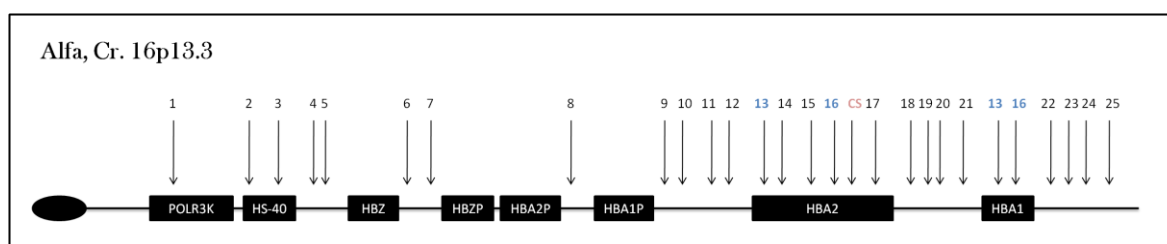


Figura 12. Representação esquemática da posição relativa de cada sonda do kit P140-B3 HBA no *cluster* α-globínico. O tamanho dos genes não está à escala.

A hibridização e amplificação foram levadas a cabo num termociclador Biometra TPersonal (Biometra GmbH, Germany). As condições do PCR incluíram 33 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s e 72°C durante 60 s, seguidos de um passo final de extensão de 72°C durante 20 minutos. Todos os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar no ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As áreas e as alturas dos picos foram analisadas e normalizadas em comparação com as áreas e alturas dos picos de amostras de indivíduos normais (sem deleções), utilizando o software recomendado pelo fabricante – Caffalyzer.NET™.

Para a interpretação dos resultados foram utilizados os seguintes critérios, de acordo com o manual do fabricante: rácio ~1 - normal; rácio < 0,75 - deleção; rácio > 1,30 - duplicação.

O MLPA HBB foi efetuado em amostras de indivíduos com doseamentos aumentados de Hb F, negativos para a pesquisa da talassémia (δβ)⁰ Spanish por GAP-PCR, bem como em amostras de indivíduos com Hb A₂ e Hb F normais que apresentaram MLPA HBA sem alterações. Como controlo positivo foram utilizadas amostras com as deleções -α^{3.7} e -α^{4.2} para o MLPA HBA e amostras com a deleção (δβ)⁰ Spanish para o MLPA HBB.

O MLPA HBA foi efetuado nos indivíduos com Hb A₂ e Hb F normais, que não apresentaram nenhuma das deleções alfa mais frequentes, pesquisadas por GAP-PCR.

3.3.4. Sequenciação genética

Foram sequenciadas três das amostras estudadas: duas para determinação dos *breakpoints* da deleção detectada por MLPA HBA (sequenciação do gene *HBA2*) e uma para esclarecimento da presença de uma variante de Hb das cadeias β (sequenciação do gene *HBB*).

Os *primers* utilizados foram os seguintes: 5'GGTGCACGAGCCGACAGCGC3' HBA comum (*forward*) e 5'GCAGGCCTGGCACCTCTCAG3' HBA2r (*reverse*) para o gene *HBA2*; 5'GAGCCAAGGACAGGTACGG3' HBB1f (*forward*) e HBB1r (*reverse*) 5'CAAAGGACTCAAAGAACCTC3' para o exão I do gene *HBB*.

Os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT[®] (USB, Cleveland, OH, USA); a sequenciação do DNA foi efetuada misturando 2 μ L de produto de PCR purificado com 1 μ L de BigDye Cycle Sequencing v1.1[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,5 μ L de *primer* [100 ng/ μ L], e 6,5 μ L de dH₂O. Utilizou-se o seguinte programa de sequenciação: 25 ciclos de (96°C durante 20 s e 60°C durante 2 min), seguidos de um passo de pausa a 4°C. O produto da sequenciação foi, seguidamente, purificado por passagem nas colunas DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN[™]), e depois carregado no equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os cromatogramas gerados foram analisados no *software* de alinhamento *Chromas Lite*, version 2.01.

3.3.5. PCR e Hibridização reversa

Para melhor caracterização molecular de duas das deleções obtidas por MLPA, utilizou-se um ensaio para detecção de mutações conhecidas no gene α -globínico, baseado na metodologia de PCR e hibridação reversa – kit α -Globin StripAssay[™], ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria.

O procedimento incluiu dois passos principais: (1) amplificação do DNA genómico por PCR com *primers* biotinilados, (2) hibridização dos produtos de amplificação em tiras teste com sondas oligonucleotídicas alelo-específicas num *array* de linhas paralelas. As sequências biotiniladas ligadas foram detetadas usando fosfatase alcalina-estreptavidina e substratos de cor.

(1) Amplificação por PCR

Para cada amostra foram preparadas duas misturas de reação: Mistura A1 (15 µL de Amplification Mix A1, 5 µL de Taq DNA Polymerase diluída (1.66 U) e 5 µL de DNA); Mistura A2 (15 µL de Amplification Mix A2, 5 µL de Taq DNA Polymerase diluída (1.66 U) e 5 µL de DNA).

O programa utilizado no termociclador foi o seguinte: pré-PCR 95°C/5 min, 97°C/40 s, 64°C/40 s, 72°C/1.30 min (3 ciclos), 97°C/40 s, 58°C/40 s, 72°C/1.30 min (37 ciclos) e extensão final de 72°C/5 min.

(2) Hibridização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação A1 e A2 obtidos para cada amostra no passo anterior foram incubados com a tira teste numa plataforma de agitação, durante 30 min a 45°C. Seguiu-se um passo de lavagem, também a 45°C, e por fim o desenvolvimento de cor, no escuro, à temperatura ambiente.

4. RESULTADOS

4.1. Deteção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ no *cluster* α por GAP-PCR

A causa mais frequente de anemia hipocrômica e microcítica com Hb A₂ normal é a presença, em heterozigotia ou em homozigotia, das deleções ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$). Estudaram-se por GAP-PCR os 50 indivíduos com valores normais de Hb A₂ e Hb F. Verificou-se que 3 apresentavam a deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigotia, 3 apresentavam a mesma deleção em homozigotia ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) e um era heterozigótico para a deleção $-\alpha^{4.2}$. Na Figura 13 pode observar-se o padrão obtido num GAP-PCR para deteção destas deleções.

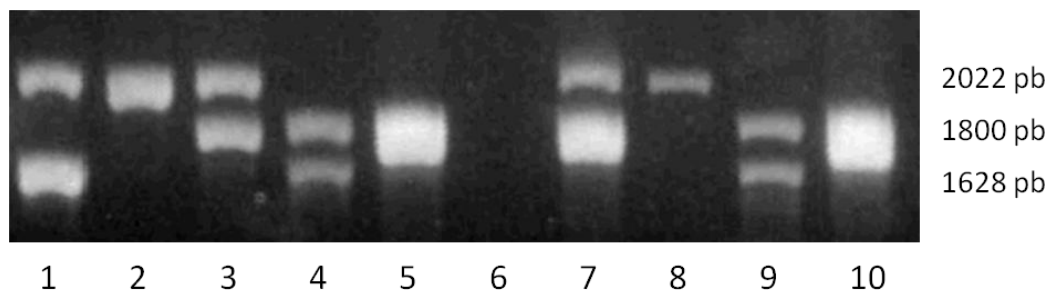


Figura 13. GAP-PCR para deteção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$. ; (1) Controlo duplo heterozigótico $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$; (2) Controlo homozigótico $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$; (3) Controlo heterozigótico $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$; (4) Controlo heterozigótico $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$; (5) Controlo normal $\alpha\alpha/\alpha\alpha$; (6) Branco; (7) Amostra heterozigótica $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$; (8) Amostra homozigótica $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$; (9) Amostra heterozigótica $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$; (10) Amostra normal $\alpha\alpha/\alpha\alpha$.

4.2. Deteção da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish por GAP-PCR

A causa mais frequente de hipocromia, microcitose com Hb A₂ normal e Hb F aumentada é a presença de deleções no *cluster* β que originam $\delta\beta$ -talassémias. Sendo a deleção $(\delta\beta)^0$ - Spanish uma das mais comuns na Península Ibérica, começou-se por determinar se estes indivíduos seriam portadores desta deleção. Constatou-se que 6 dos 8 indivíduos estudados eram portadores da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish. Na Figura 14 pode observar-se o padrão obtido num GAP-PCR para deteção desta deleção.

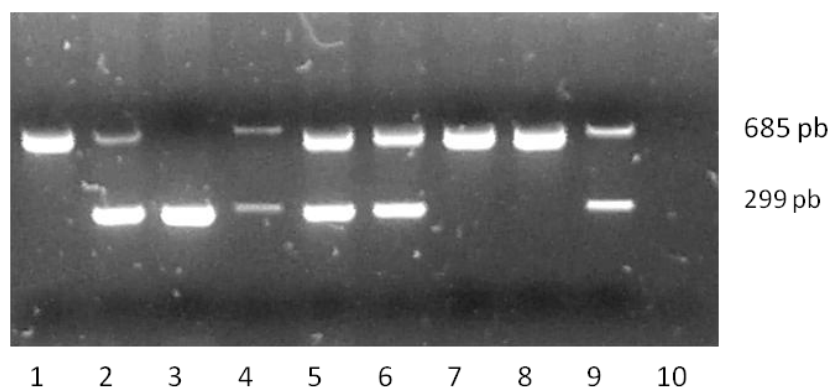


Figura 14. GAP-PCR para detecção da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish. (1) Controlo normal; (2) Controlo heterozigótico; (3) Controlo homozigótico; (4,5,6 e 9) Amostras heterozigóticas; (7 e 8) Amostras normais; (10) Branco.

4.3. Detecção das deleções menos frequentes nos *clusters* α e β por MLPA

Efetuuou-se o MLPA HBA nas amostras dos indivíduos com valores de Hb A₂ e Hb F normais, que não apresentaram nenhuma das deleções α mais frequentes, pesquisadas por GAP-PCR. Amostras com as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ foram utilizadas como controlo positivo.

Efetuuou-se o MLPA HBB nos indivíduos com Hb A₂ normal e Hb F aumentada, que foram negativos para a pesquisa da deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish por GAP-PCR, bem como nos indivíduos com Hb A₂ e Hb F normais que apresentaram MLPA HBA sem alterações. Utilizaram-se como controlo positivo as amostras com a deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish.

A análise dos resultados do MLPA HBA revelou a presença de dez deleções diferentes. Estas deleções removem os genes α (seis deleções) ou os elementos reguladores desse *cluster* (quatro deleções).

Na análise dos resultados do MLPA HBB detetou-se uma deleção β que leva à redução da intensidade do sinal de todas as sondas.

Os gráficos seguintes apresentam os resultados obtidos com a técnica de MLPA. Neles estão representados os vários tipos de deleções encontrados.

Em primeiro lugar são apresentados os gráficos das amostras controlo positivo: $-\alpha^{3.7}$ em heterozigotia (Figura 15), $-\alpha^{3.7}$ em homozigotia (Figura 16), $-\alpha^{4.2}$ em heterozigotia (Figura 17), e a deleção $(\delta\beta)^0$ Spanish em heterozigotia (Figura 18). Nas figuras 19 a 29 estão representados os gráficos de MLPA das restantes amostras estudadas.

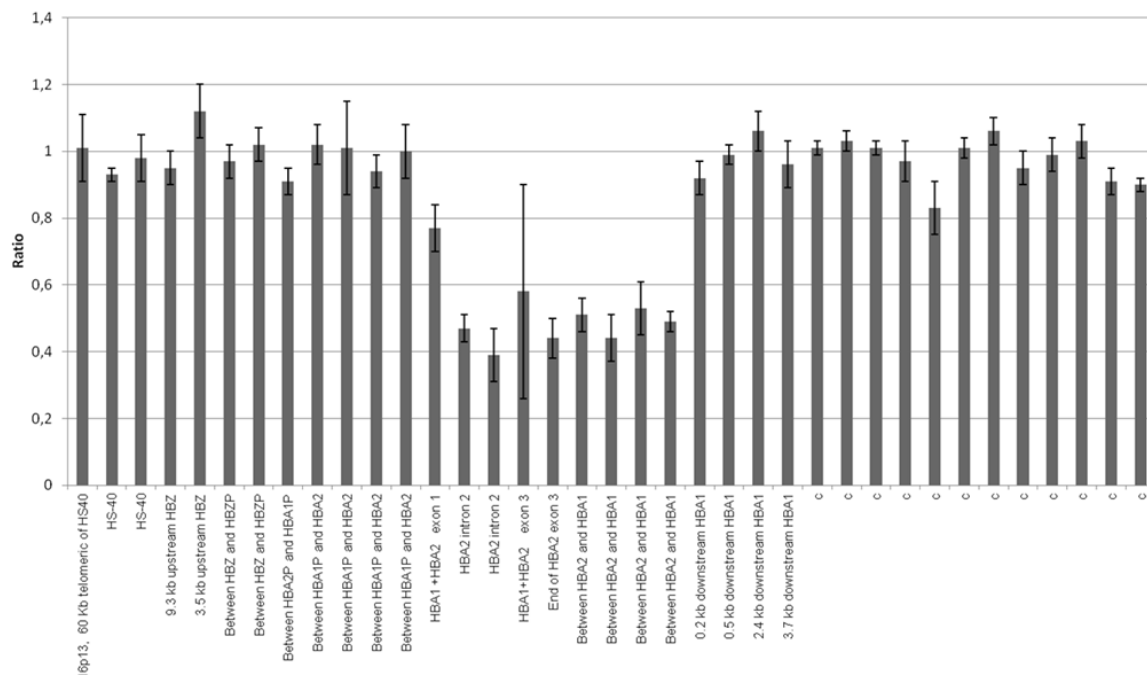


Figura 15. MLPA *HBA* - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção - $\alpha^{3.7}$ em heterozigotia (Tabela 1 – indivíduos A1, A2 e A3). Sondas C - Sondas controlo.

Nas amostras controlo com a deleção - $\alpha^{3.7}$ em heterozigotia (Figura 15) detetou-se uma diminuição da intensidade do sinal das sondas 13 a 22 para valores inferiores a 75%. As sondas 13 e 16 ligam-se tanto a *HBA2* como a *HBA1* (Figura 12). Como esta deleção apenas elimina um dos genes α , a intensidade do sinal ($\sim 0,7$) é superior ao das restantes sondas ($\sim 0,5$). Estima-se, portanto, que o *breakpoint* a 5' se localize numa região de 0,7 Kb entre o gene *HBA1P* e o 1º exão do gene *HBA2*. Por outro lado, o *breakpoint* a 3' localizar-se-á na região de ~ 1 Kb entre o final do gene *HBA2* e o início do gene *HBA1*.

O mesmo foi observado para a deleção - $\alpha^{3.7}$ em homozigotia (Figura 16). A intensidade do sinal das sondas 13 e 16 diminuiu para $\sim 0,5$ (deleção de dois genes α , um em cada cromossoma). As sondas 14, 15 e 18-22 não foram detetadas, pois a deleção eliminou completamente os seus locais de ligação, em ambos os cromossomas.

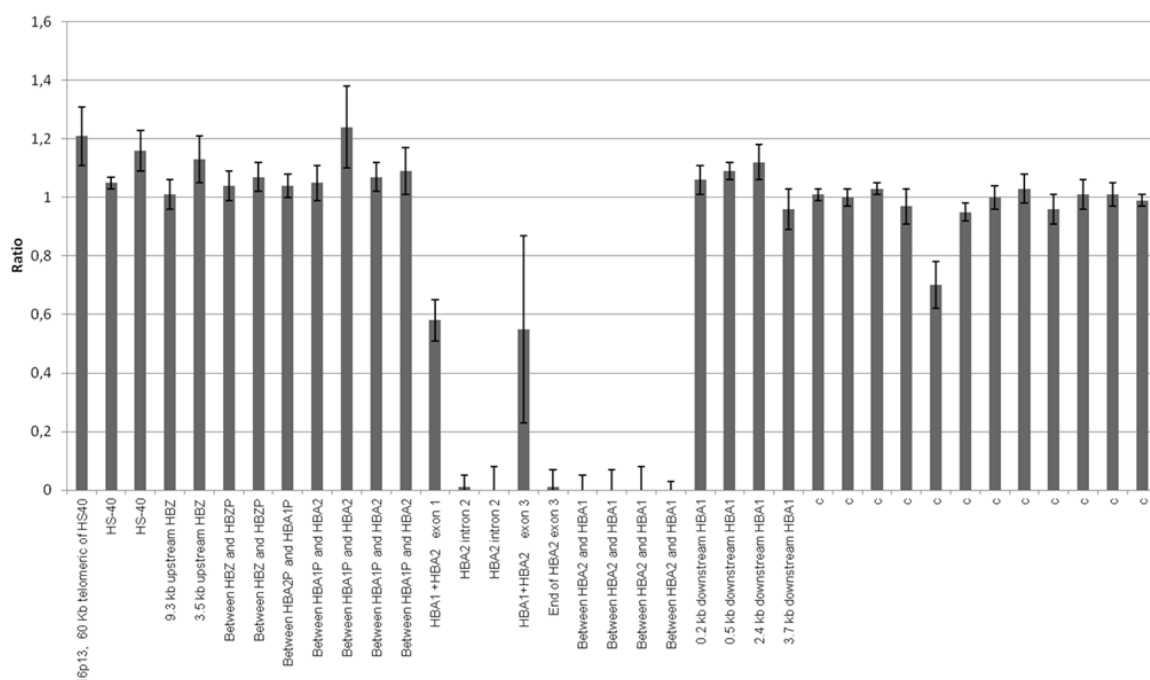


Figura 16. MLPA *HBA* - Representação do padrão do rácio das sondas para a deleção - $\alpha^{3.7}$ em homozigotia (Tabela 1 – indivíduos A4, A5 e A6).

O gráfico do MLPA para as amostras controlo com a deleção - $\alpha^{4.2}$ em heterozigotia (Figura 17) mostra uma redução da intensidade do sinal das sondas 12, 14, 15, 17 e 18 para valores de cerca de 50% do normal. Do mesmo modo que na deleção - $\alpha^{3.7}$, as sondas 13 e 16 também apresentam uma intensidade de sinal de cerca de 70%, consistente com a deleção de um único gene α . Estima-se que o *breakpoint* a 5' se localize numa região de 1,9 Kb correspondente à distância entre as sondas 11 e 12, na região intergénica de *HBA1P* e *HBA2*. O *breakpoint* a 3', por sua vez, localizar-se-á numa região de 0,6 Kb, correspondente à distância entre as sondas 18 e 19, na região intergénica de *HBA2* e *HBA1* eliminando, deste modo, todo o gene *HBA2*.

No que respeita às amostras com a deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish (Figura 18) observou-se uma perda de heterozigotia em 12 das 28 sondas utilizadas. As sondas 17 a 24 e 26 a 28 têm uma intensidade de sinal de cerca de 50% relativamente ao normal. A sonda 25 tem um rácio inferior a 0,2. De acordo com o manual do fabricante, algumas sondas exónicas podem apresentar variabilidade de sinal, particularmente se a amostra de DNA estiver contaminada com RNA. Através desta técnica, conseguiu-se estimar que o *breakpoint* a 5' para a talassémia ($\delta\beta$)⁰ Spanish se localiza na região de 3,4 Kb correspondente à distância entre as sondas 16 e 17, a montante do gene *HBD*. Não foi, contudo, possível determinar a localização do *breakpoint* a 3'.

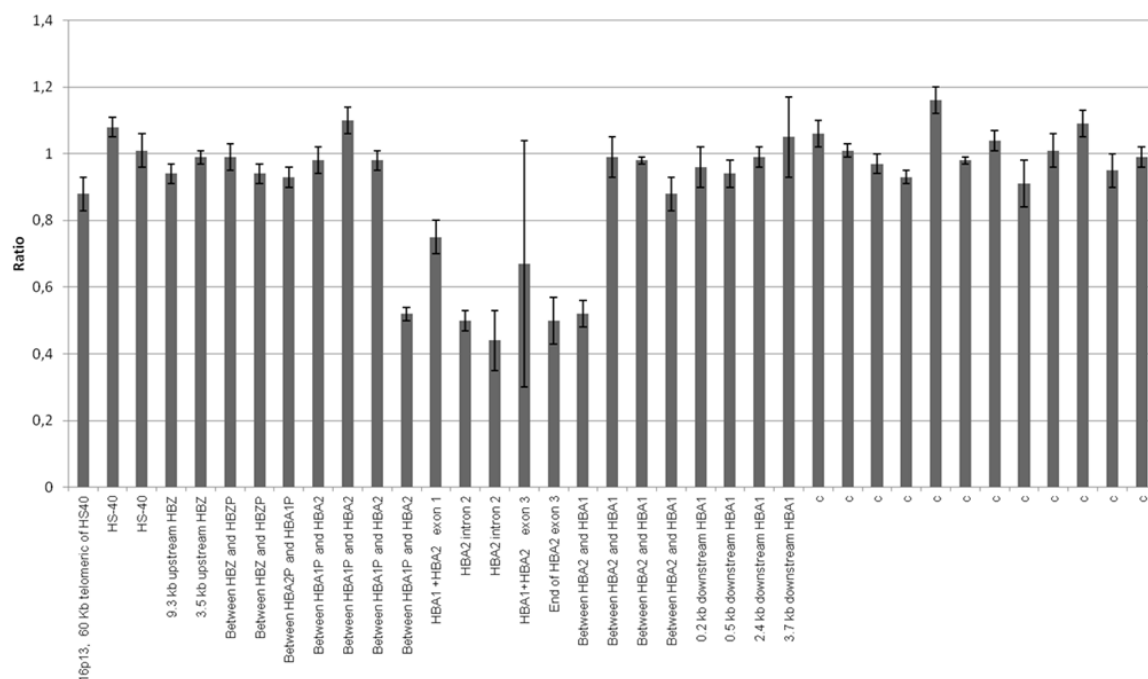


Figura 17. MLPA *HBA* - Representação do padrão do rácio das sondas para a deleção - $\alpha^{4.2}$ em heterozigotia (Tabela 1 – indivíduo A7).

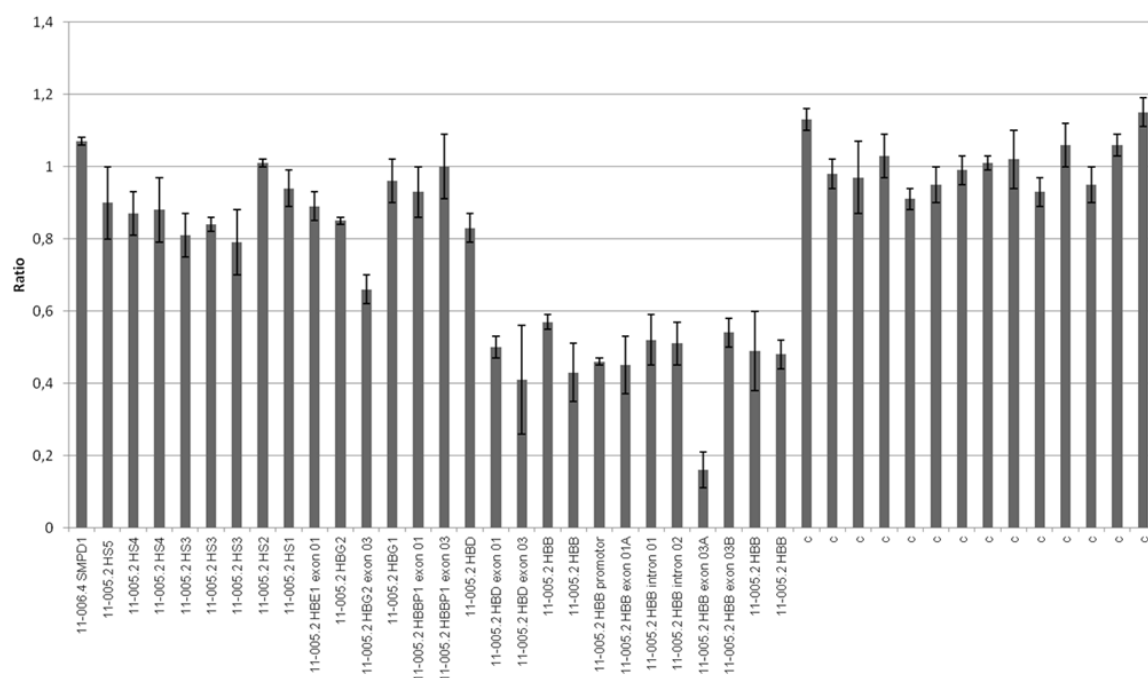


Figura 18. MLPA *HBB* - Gráfico representativo do padrão do rácio das sondas para a deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish (Tabela 2 – indivíduos B1 a B6). Sondas C - Sondas controlo.

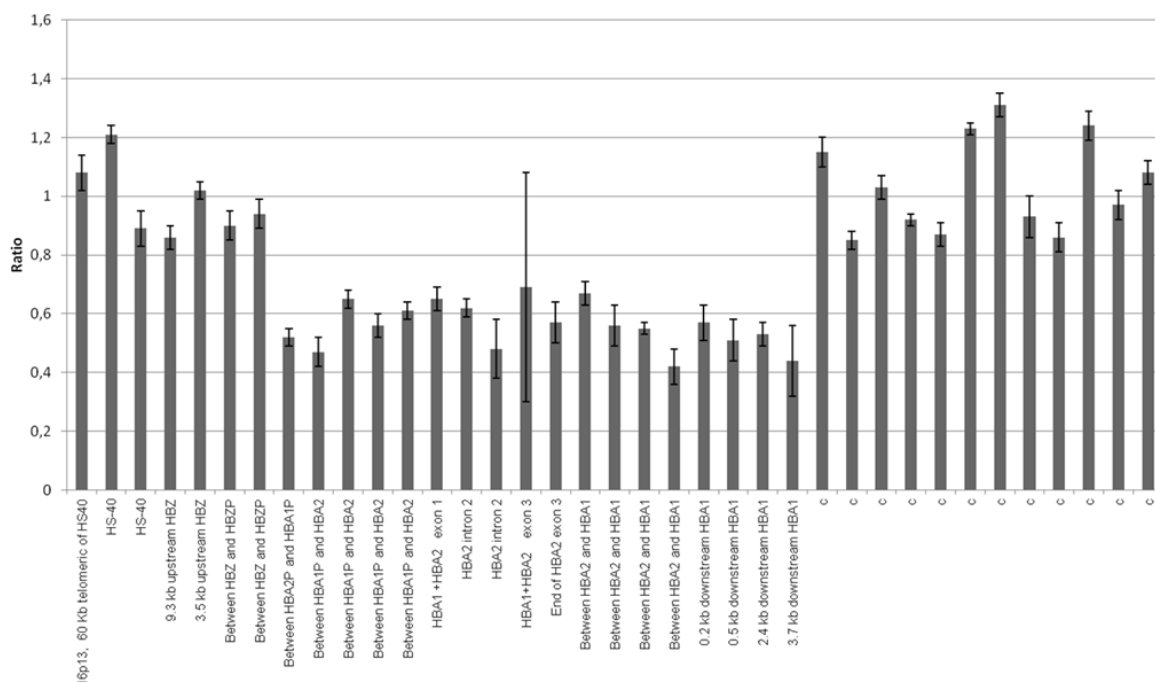
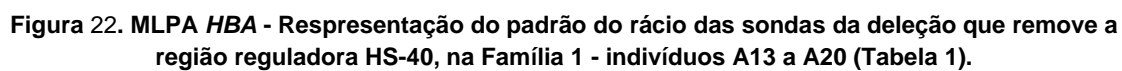


Figura 20. MLPA *HBA* - Padrão do rácio das sondas obtido para os indivíduos A9, A10 e A11 (Tabela 1).

A amostra do indivíduo A12, após comparação com os rácios esperados para algumas das deleções já descritas, apresentava um padrão compatível com a deleção $\alpha^{20.5}$ (Figura 21). Efetuou-se a confirmação por PCR e hibridização reversa. O rácio das sondas diminuiu para 50% do normal em 15 das 25 sondas utilizadas. A sonda 16 apresenta um rácio de cerca de 0,75, consistente com o facto de, estando esta deleção em heterozigotia, só ter sido eliminado um gene alfa ($-\alpha/\alpha$). Com efeito, o *breakpoint* a 3' desta deleção localiza-se numa região de 0,6 Kb correspondente à distância entre as sondas 21 e 22, entre os genes *HBA2* e *HBA1*. O *breakpoint* a 5' localiza-se numa região de cerca de 10,1 Kb, que corresponde à distância entre as ondas 5 e 6, e compreende todo o gene *HBZ*.

A deleção detetada nos membros de uma família açoreana (Família 1), remove a região reguladora HS-40, afetando 4 das 25 sondas utilizadas (Figura 22). Com este kit de MLPA não foi possível determinar o limite a 5'. Dada a proximidade do telómero, é possível que a deleção se estenda até ele. Estima-se que o *breakpoint* a 3' se localize numa região de 5,7 Kb (entre as sondas 4 e 5) a cerca de 3,5 Kb a montante do gene *HBZ*.



Na Figura 23 pode observar-se uma grande deleção que remove ambos os genes *HBA* (-/-αα). Das 25 sondas utilizadas, 16 apresentam uma redução da intensidade do sinal de ~50%. Estimou-se que esta deleção possui o seu *breakpoint* a 5' numa região de 3,3 Kb (distância entre as sondas 6 e 7) entre os genes *HBZ* e *HBZP*. O *breakpoint* a 3' situa-se numa região de 1,9 Kb (distância entre as sondas 24 e 25) a jusante de *HBA1*.

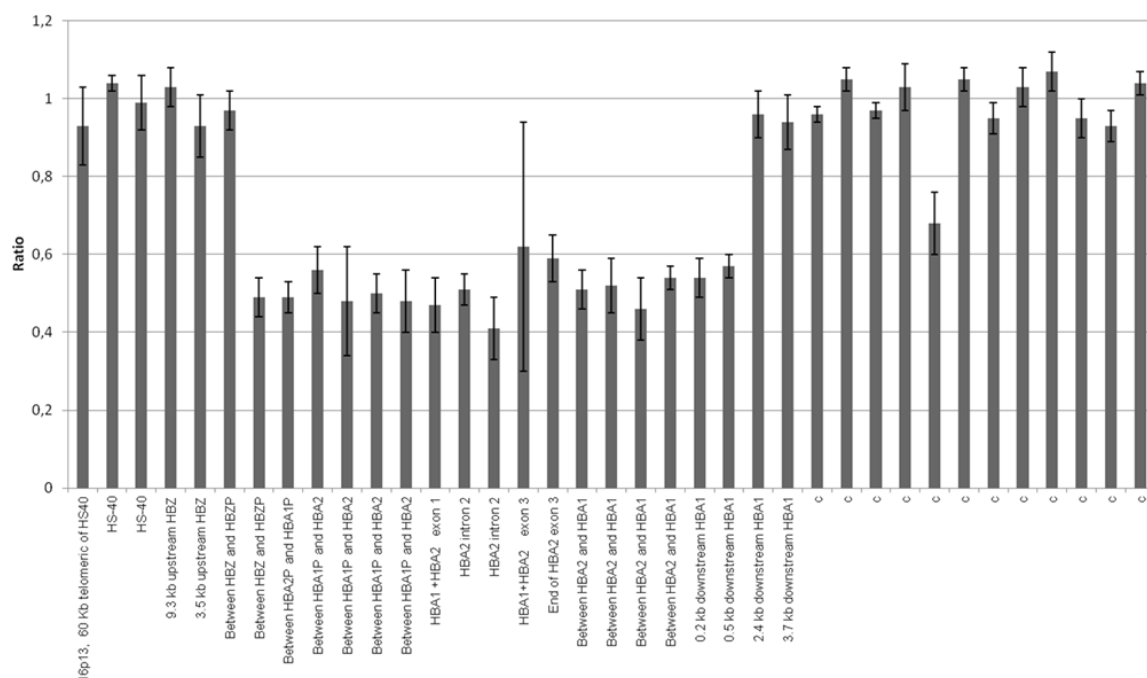
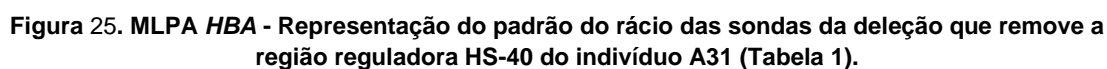
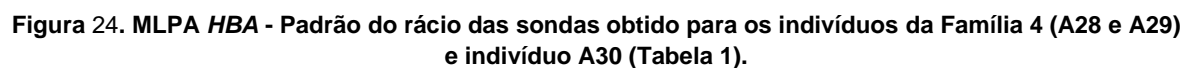


Figura 23. MLPA *HBA* - Representação do padrão do rácio das sondas da deleção, em heterozigotia, dos indivíduos A21 a A24 pertencentes à Família 2; A26 e A27 pertencentes à Família 3 (Tabela 1).

Na Família 4 e no indivíduo A30 foi detetado um padrão compatível com a presença de uma deleção que afeta apenas 2 das 25 sondas utilizadas (Figura 24). Estas sondas (14 e 15) localizam-se no 2º intrão do gene *HBA2* e estão separadas por cerca de 100 bases. Dado ser uma alteração bastante pequena, procedeu-se à sequenciação do gene *HBA2* para tentar esclarecer a sua natureza. Os resultados da sequenciação revelaram a presença de uma *frameshift - patchwork* α12 (descrita no ponto 4.5).

Na deleção detetada no indivíduo A31 (Figura 25) também só 2 das 25 sondas utilizadas apresentam perda de heterozigotia. Contudo, estas sondas (2 e 3) localizam-se na região reguladora HS-40. Através desta técnica consegue-se estimar que o *breakpoint* a 5' se localize numa região de 60,2 Kb (correspondente à distância entre as sondas 1 e 2) a montante de HS-40. O *breakpoint* a 3' localizar-se-á numa região de 29,3 Kb (que corresponde à distância entre as sondas 3 e 4) a jusante de HS-40.



Resumindo, foram estudadas por MLPA 13 deleções diferentes no *cluster* α (Figura 30) e 2 no *cluster* β (Figura 31).

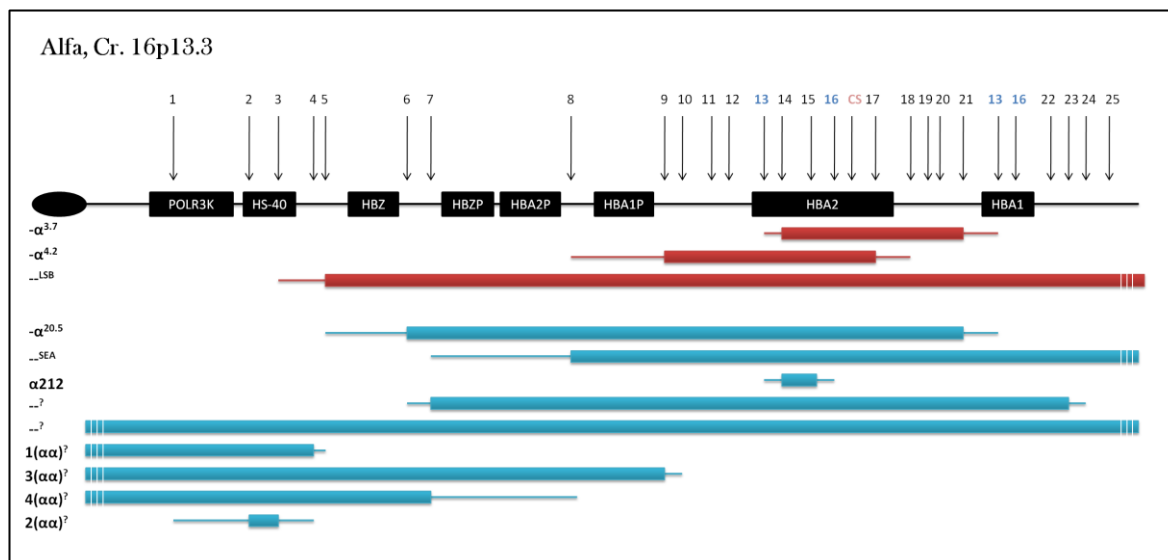


Figura 30. Esquema do *cluster* α -globínico. Os números e as setas indicam a localização das sondas do kit MLPA HBA no *cluster* α . Números a azul - sondas que se repetem em ambos os genes *HBA*. CS - sonda que deteta a mutação que origina a Hb Constant-Spring. As deleções encontradas estão representadas por barras sólidas; as linhas correspondem à região onde se localizam os *breakpoints*. O tracejado nas barras indica que a deleção de prolonga para 5' (da 1ª sonda) ou para 3' (da 25ª sonda). A elipse a negro representa o telômero do cromossoma 16. A posição dos genes e o seu tamanho não estão à escala.

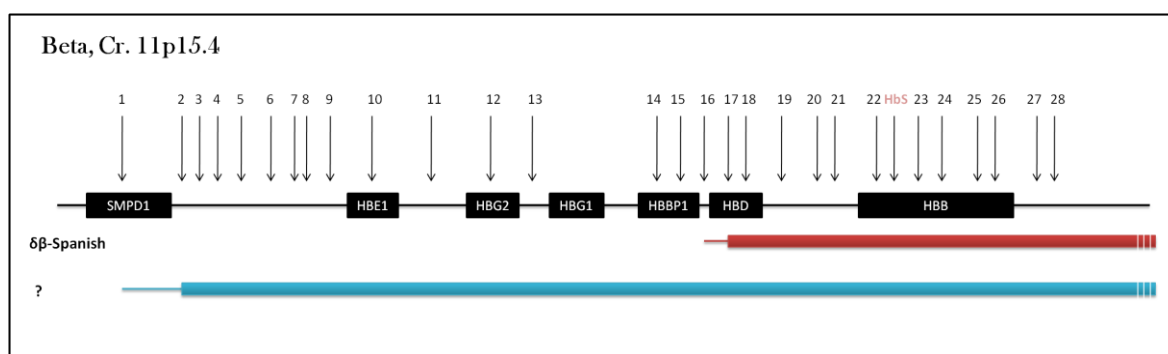


Figura 31. Esquema do *cluster* β -globínico. Os números e as setas indicam a localização das sondas do kit MLPA HBB no *cluster* β . HbS - sonda que deteta a mutação *HBB* CD6 (GAG>GTG) - Hb S. As deleções encontradas estão representadas por barras sólidas; as linhas correspondem à região onde se localizam os *breakpoints*. O tracejado nas barras indica que a deleção de prolonga para 3' em relação à 28ª sonda. A posição dos genes e o seu tamanho não estão à escala.

4.4. PCR e Hibridização reversa para confirmação da presença das deleções --^{SEA} e - $\alpha^{20.5}$

Como referido anteriormente, o padrão dos picos observado nos indivíduos A9, A10, A11 e A12, em comparação com o padrão esperado fornecido pela casa comercial do Kit MLPA *HBA*, sugeriu a presença de duas deleções já descritas: a --^{SEA} e a - $\alpha^{20.5}$, respetivamente. Para confirmar esta suspeita utilizou-se a técnica de hibridização reversa, utilizando o kit α -Globin StripAssay™ (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria). Os resultados vieram confirmar a presença das referidas deleções (Figura 32).

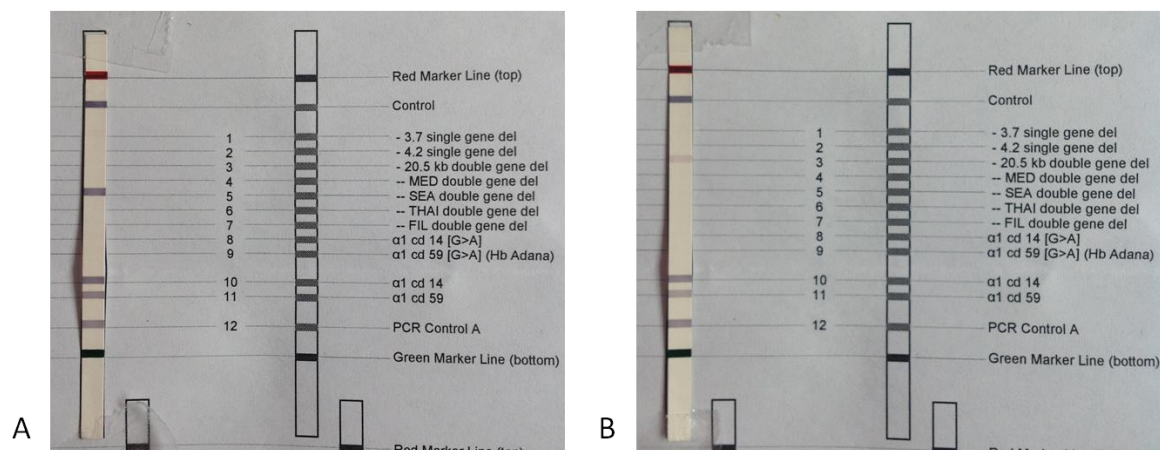


Figura 32. Resultados da técnica de hibridização reversa para (A) os indivíduos A9, A10 e A11 e (B) o indivíduo A12.

4.5. Sequenciação dos genes *HBB* e *HBA2*

Seguidamente são apresentados os resultados da sequenciação do gene *HBA2* dos indivíduos A28 e A29 (Família 4) e A30, e da sequenciação do gene *HBB* do indivíduo A6.

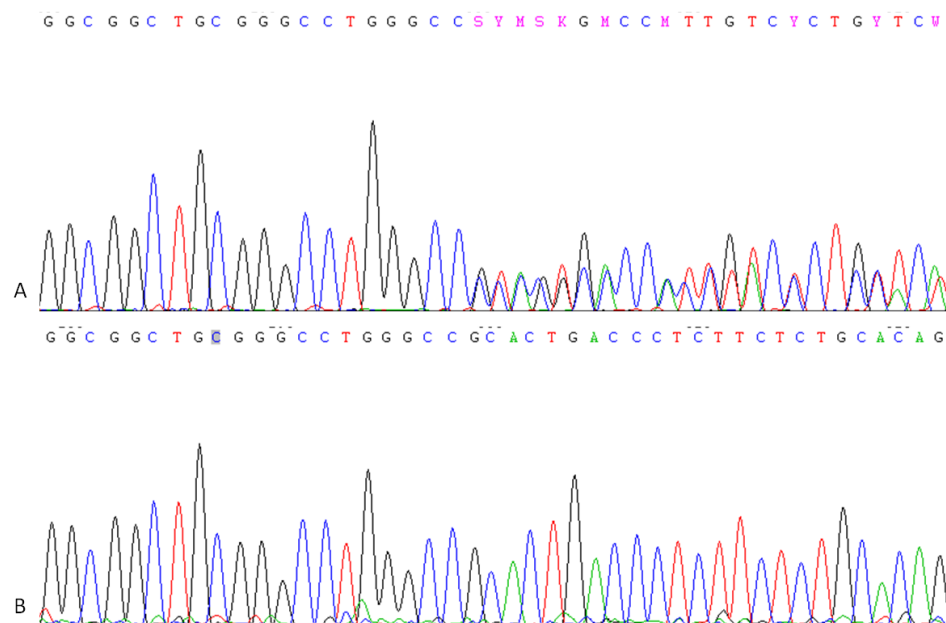


Figura 33. Sequenciação do gene *HBA2* dos indivíduos A28, A29 e A30. Apresentam a deleção/substituição também designada *patchwork* α12. (A) Amostra; (B) Controlo normal.

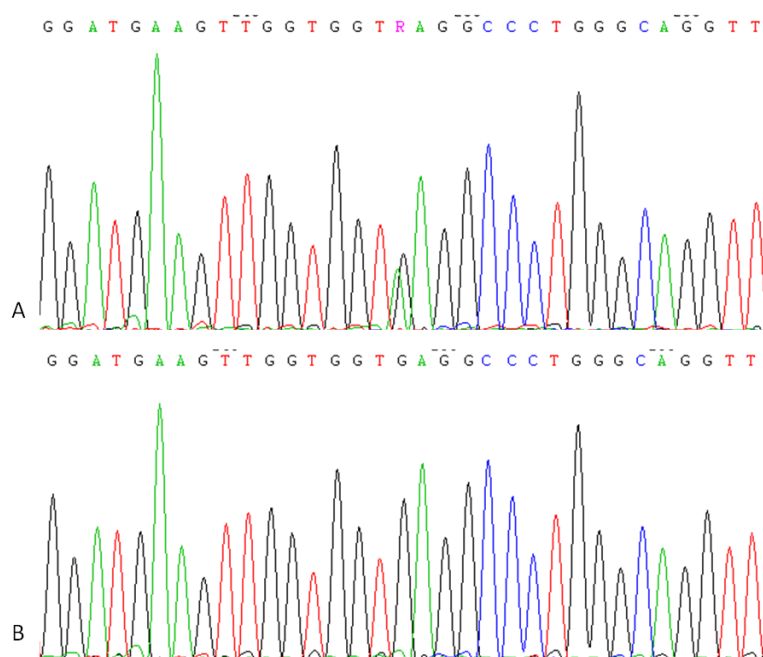


Figura 34. Sequenciação do gene *HBB* do indivíduo A6. Apresenta uma mutação pontual no 1º exão deste gene - (Hb E, c.79G>A; p.Glu27Lys) – em heterozigotia. (A) Amostra; (B) Controlo normal.

Na sequência do gene *HBA2* dos indivíduos A28, A29 e A30 encontrou-se uma pequena deleção/substituição evidenciada pela presença de uma *frameshift*, que começa na posição IVSII-119 (Figura 33). Após consulta da base de dados de mutações HGMD BioBase chegou-se à conclusão que se trata de um rearranjo já descrito, denominado *patchwork* α 212, que resulta da substituição de uma guanina (G), do gene *HBA2* na posição IVSII-119, por um octanucleótido (CTCGGCCC) pertencente ao gene *HBA1*.

O indivíduo A6 apresenta heterozigotia para a mutação *missense* c.79G>A; p.Glu27Lys (Hb E) no gene *HBB* (Figura 34). Este indivíduo possui, também, a deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigotia (Tabela 1).

4.6. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas em relação às alterações encontradas

As tabelas seguintes pretendem resumir os resultados obtidos para cada um dos indivíduos envolvidos neste estudo. Na Tabela 1 estão representados os indivíduos que apresentaram deleções no *cluster* α e na Tabela 2 os que apresentaram deleções no *cluster* β . Na Tabela 3 estão incluídos os indivíduos em que não foi possível detetar qualquer deleção, nem por GAP-PCR nem por MLPA.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos que apresentam deleções no *cluster* α .

Indivíduo	Família	Sexo-Idade	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	A2 (%)	F (%)	Perfil	MLPA HBA	MLPA HBB
A1	2	F-29	11,9	81,1	27,0	14,0	2,4	1,0	AA2	-α ^{3,7} Het	NE
A2	-	F-64	11,5	79,6	27,2	14,0	2,3	0,8	AA2		
A3	-	F-76	12,2	79,4	26,8	16,0	2,2	0,3	AA2		
A4	-	F-28	12,6	70,3	22,6	15,0	2,6	2,0	AA2	-α ^{3,7} Homo	NE
A5	-	F-62	12,0	75,0	23,6	13,0	2,5	0,2	AA2		
A6	-	F-5	11,9	72,7	20,8	14,0	20,4	1,2	AX		
A7	-	M-69	15,7	79,2	26,3	14,0	2,6	0,4	AA2	α ^{4,2} Het	NE
A8	-	M-6	-	-	-	-	-	-	-	-- ^{LSB}	NE
A9	-	M-58	14,6	71,5	22,4	14,7	2,6	1,8	AA2	-- ^{SEA}	NE
A10	-	M-50	13,9	64,4	20,1	15,3	2,4	1,0	AA2		
A11	-	F-2	12,3	60,1	32,7	19,8	2,5	1,0	AA2		
A12	-	F-19	12,6	67,9	21,9	15,0	2,3	0,5	AA2	-α ^{20,5}	NE
A13	1	F-42	12,4	67,5	21,0	15,0	2,8	0,4	AA2	1(αα) [?]	NE
A14	1	M-17	12,6	64,6	19,7	15,4	2,6	0,4	AA2		
A15	1	M-17	12,8	64,2	19,9	15,6	2,6	0,4	AA2		
A16	1	F-29	10,9	73,2	19,4	16,0	2,6	0,5	AA2		
A17	1	M-3	10,2	68,0	18,2	20,0	2,7	1,1	AA2		
A18	1	M-53	13,8	70,5	21,8	17,0	2,6	0,6	AA2		
A19	1	F-25	11,4	64,0	21,0	15,3	2,9	0,7	AA2		
A20	1	M-?	15,4	73,0	23,0	14,0	2,4	1,0	AA2		
A21	2	F-31	12,1	68,7	22,1	13,0	2,5	0,3	AA2	-- [?]	NE
A22	2	M-?	13,3	66,0	21,0	17,0	2,1	1,0	AA2		
A23	2	M-?	13,7	67,7	21,6	13,6	2,6	0,7	AA2		
A24	2	F-?	10,7	60,0	20,0	18,0	2,2	1,0	AA2		
A25	2	F-8	8,5	56,0	15,3	23,0	1,6	1,1	AA2	--/-α ^{3,7}	NE
A26	3	F-20	12,1	63,7	20,9	15,4	2,5	0,3	AA2	-- [?]	
A27	3	M-52	13,1	63,6	19,8	18,2	2,5	0,4	AA2		
A28	4	M-32	12,9	73,8	24,6	14,7	3,1	0,8	AA2	α212	
A29	4	M-55	14,0	78,3	25,4	16,1	2,7	0,3	AA2		
A30	-	F-35	12,7	76,4	24,5	14,8	2,4	0,2	AA2		
A31	-	F-71	12,6	69,3	21,6	15,3	2,4	0,4	AA2	2(αα) [?]	NE
A32	-	F-11	10,9	64,9	20,5	14,7	2,7	0,3	AA2	3(αα) [?]	NE
A33	-	F-11	11,4	65,0	21,0	13,0	2,6	0,3	AA2	4(αα) [?]	NE
A34	-	F-49	11,4	65,8	20,1	15,0	2,4	0,4	AA2	-- [?]	NE

Nota: * valor respeitante ao total de Hb A₂ + Hb E (variante das cadeias β que elui com a Hb A₂); NE - não efetuado. Os indivíduos que não estão associados a nenhuma família, não estão relacionados, apesar de alguns possuírem a mesma deleção.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos que apresentam deleções no *cluster* β .

Indivíduo	Sexo-Idade	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	A2 (%)	F (%)	Perfil	MLPA HBA	MLPA HBB
B1	F-37	12,2	64,7	17,1	18,0	3,0	2,9	AA2F	NE	Spanish $\delta\beta^0$ -tal
B2	M-?	10,4	67,1	17,8	18,0	3,1	3,9	AFA2		
B3	M-?	10,5	67,6	17,2	19,0	3,2	5,3	AFA2		
B4	M-?	21,5	74,3	20,4	23,0	2,9	5,3	AFA2		
B5	F-?	20,9	74,3	20,7	22,0	3,1	3,4	AFA2		
B6	M-?	10,7	78,0	21,0	23,0	3,0	4,9	AFA2		
B7	F-27	11,2	57,7	18,9	14,0	3,0	0,6	AA2	S/A	$\epsilon\gamma\delta\beta$ -tal

Notas: NE - não efetuado; S/A - sem alterações.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos e estudo de hemoglobinas dos indivíduos estudados que não apresentam deleções no *cluster* β nem no *cluster* α .

Indivíduo	Sexo-Idade	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	A2 (%)	F (%)	Perfil	MLPA HBA	MLPA HBB
N1	M-33	11,3	79,8	26,8	13,0	2,3	0,3	AA2	S/A	S/A
N2	F-42	10,8	77,6	22,0	14,2	3,0	0,4	AA2	S/A	S/A
N3	M-21	12,9	74,4	23,8	16,0	2,7	0,3	AA2	S/A	S/A
N4	F-32	12,3	76,1	24,8	15,0	2,9	0,2	AA2	S/A	S/A
N5	M-19	15,7	75,3	23,2	13,0	2,6	0,2	AA2	S/A	S/A
N6	M-7	8,9	70,0	17,7	23,0	2,4	6,0	AFA2	NE	S/A
N7	F-78	15,2	79,1	25,6	13,0	2,8	0,3	AA2	S/A	S/A
N8	F-20	13,0	71,1	23,0	16,5	2,7	0,3	AA2	S/A	S/A
N9	F-52	12,9	69,8	23,6	15,8	2,5	0,4	AA2	S/A	S/A
N10	M-41	15,0	77,1	22,3	14,0	2,9	0,3	AA2	S/A	S/A
N11	M-37	14,9	79,9	26,7	12,0	2,9	1,0	AA2	S/A	S/A
N12	M-4	11,6	74,0	23,9	14,0	3,0	0,8	AA2	S/A	S/A
N13	M-73	16,2	77,9	26,3	15,0	2,7	0,2	AA2	S/A	S/A
N14	M-25	13,0	76,9	26,2	13,0	3,1	0,1	AA2	S/A	S/A
N15	F-42	11,8	71,7	24,9	18,0	2,5	0,1	AA2	S/A	S/A
N16	M-12	12,7	70,0	21,6	14,0	2,3	0,1	AA2	S/A	S/A
N17	M-19	14,2	78,1	27,7	13,0	2,6	6,7	AFA2	NE	S/A

Notas: NE - não efetuado; S/A - sem alterações.

5. DISCUSSÃO

5.1. Deleções identificadas por MLPA

Neste estudo utilizou-se a metodologia de MLPA para efetuar o screening de deleções nos *clusters* α e β -globínicos. Esta técnica provou ser um método fiável para detetar grandes deleções nos casos que ficaram por resolver após utilização das técnicas convencionais de biologia molecular (GAP-PCR), tanto nas deleções já descritas, como nas desconhecidas.

Deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$

Amostras com a deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ foram usadas como controlo por apresentarem um padrão de redução de sinal das sondas do kit de MLPA HBA muito característico. Como se pode observar na Figura 15, para a deleção $-\alpha^{3.7}$, existe uma perda de heterozigotia em 7 das 37 sondas utilizadas. Duas delas (sonda 13 e sonda 16) apresentam um rácio de $\sim 0,7$ e $\sim 0,6$, respetivamente. Isto é esperado, já que estas sondas ligam tanto no gene *HBA2* como no gene *HBA1*, em ambos os cromossomas. A técnica de MPLA consegue delimitar completamente a deleção $-\alpha^{3.7}$. Percebe-se que a deleção começa entre o pseudogene *HBA1P* e o 1º exão do gene *HBA2*, terminando no início do gene *HBA1*. Na Figura 16 pode observar-se a mesma deleção, mas em homozigotia.

Da mesma forma, as amostras com a deleção $-\alpha^{4.2}$ (Figura 17) também possuem um padrão típico de perda de heterozigotia das sondas do kit MLPA HBA, e que permite distingui-las facilmente das que possuem a deleção $-\alpha^{3.7}$.

Estas deleções ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) foram originalmente caracterizadas, utilizando mapeamento por enzimas de restrição, numa tentativa de se estabelecerem os limites das mesmas (55)(56). A localização exacta dos *breakpoints* de ambas as deleções é desconhecida. Para a deleção $-\alpha^{3.7}$ apenas se sabe que os *breakpoints* se localizam no início dos genes *HBA2* (a 5') e *HBA1* (a 3'). O produto desta deleção é um gene “de fusão” perfeitamente funcional constituído por uma pequena parte de *HBA2* e o resto de *HBA1*. Do mesmo modo, apenas se sabe que os *breakpoints* da deleção $-\alpha^{4.2}$ se localizam a montante do gene *HBA2* (a 5') e a montante do gene *HBA1* (a 3'), tendo como resultado a completa eliminação do gene *HBA2*. De acordo com Embury et al. (56) tanto a deleção $-\alpha^{3.7}$ como a $-\alpha^{4.2}$ podem resultar de eventos de *crossover* inter ou intra-cromossomais que estão

relacionados com o facto de existir uma grande homologia entre as sequências flanqueadoras de ambos os genes normais, que se estende até 3 Kb a 5' dos mesmos.

Deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish

Relativamente à deleção ($\delta\beta$)⁰ Spanish (Figura 18) observou-se uma perda de heterozigotia em 12 das 42 sondas utilizadas. Através desta técnica consegue-se perceber onde começa a deleção – entre a sonda 16, localizada a 5' do gene *HBD*, e a sonda 17, localizada no 1º exão do gene *HBD*; contudo, não se consegue dizer onde termina pois a última sonda do kit (localizada 9 Kb a jusante do gene *HBB*), que apresenta perda de heterozigotia, não corresponde ao fim do *cluster* β -globínico.

Guzmán et al (31) procuraram caracterizar a extensão desta deleção em portadores de ($\delta\beta$)⁰ Spanish mexicanos não relacionados, tendo chegado à conclusão que a mesma se estende por 89,548 pb no *cluster* β . O *breakpoint* a 5' localiza-se no início das repetições *Alu* localizadas 2,5 Kb a montante do gene *HBD*. O *breakpoint* a 3' localiza-se 7,0 Kb a jusante do gene do receptor olfativo *OR52A1* e 11,7 Kb a montante do gene *OR52A5*. No total são eliminados 6 genes: os genes *HBD* e *HBB*, 2 genes olfativos (*OR51V1* e *OR52A1*) e dois pseudo-genes (*OR52Z1P* e *OR51A1P*).

Deleção --^{LSB}

No que diz respeito à deleção --^{LSB} (Figura 19), observa-se uma perda de heterozigotia em 22 das 37 sondas utilizadas. O padrão do rácio das sondas de MLPA sugere que a deleção se inicia a montante do gene *HBZ*, nada se podendo concluir em relação à região onde termina.

Esta deleção foi descrita pela primeira vez por Coelho et al. (57) num indivíduo português oriundo de Lisboa. Utilizando sondas adicionais como extensão ao kit MLPA HBA, conseguiram determinar que a mesma se estende por 127 Kb, apresentando o *breakpoint* a 5' numa região de 13,1 Kb a montante de gene ζ 2-globínico. O *breakpoint* a 3' situa-se numa região de cerca de 27 Kb, entre os genes *RGS11* e *AXIN1*, removendo completamente os dois genes α .

Deleção --^{SEA}

A deleção --^{SEA} (Figura 20) foi detetada em 3 indivíduos de ascendência asiática não relacionados, todos com hipocromia e microcitose persistentes da causa a esclarecer. Esta deleção afetou 18 das 25 sondas do kit MLPA HBA utilizadas. De acordo com os resultados obtidos, estimou-se que o seu *breakpoint* a 5' se localiza na região de 4,6 Kb que compreende os pseudo-genes *HBZP* e *HBA2P* (entre as sondas 7 e 8). No entanto, também não foi possível determinar até onde se estende esta deleção, pois a sonda 25 (última sonda do kit) tem a sua intensidade de sinal diminuída.

Nava et al. (58) caracterizaram molecularmente a deleção --^{SEA}, através de sequenciação, em pacientes mexicanos de ascendência asiática, com hipocromia e microcitose. A sequenciação revelou que o alelo --^{SEA} possui o *breakpoint* a 5' na terceira base do codão 28 do gene *HBA2P*, e o *breakpoint* a 3' na sequência *Alu-Jo*, 1,328 nucleótidos a montante de 3'HVR. Estes resultados são consistentes com o obtido por MLPA. A deleção --^{SEA} terá possivelmente resultado de um evento de recombinação ilegítima associada a duas sequências invertidas: uma localizada no gene *HBA2P* (5'GGAGGTTC3') e outra na região 3'HVR (5'CTTGGAGG3') (58).

Deleção - α ^{20.5}

Na deleção - α ^{20.5} (Figura 21), detetada no indivíduo A12, constatou-se que existe uma perda de heterozigotia em 15 das 25 sondas utilizadas. Conseguiu-se estimar que o *breakpoint* a 3' desta deleção se localiza numa região de 0,6 Kb correspondente à distância entre as sondas 21 e 22, entre os genes *HBA2* e *HBA1*. O *breakpoint* a 5' localiza-se numa região de cerca de 10,1 Kb, que corresponde à distância entre as sondas 5 e 6, que compreende todo o gene *HBZ*. No processo são eliminados três pseudo-genes (*HBZP*, *HBA2P* e *HBA1P*) e o gene *HBA2*. Da pesquisa bibliográfica efetuada, não foi possível encontrar referências aos limites desta deleção.

Deleções da região reguladora HS-40

A técnica de MLPA permitiu a elucidação de 4 casos em que houve deleção da região reguladora HS-40 do *cluster* α . Encontraram-se 4 deleções (Figura 30, 1(α)², 2(α)², 3(α)² e 4(α)²), de diferentes tamanhos, que removem completamente esta região.

A primeira, detetada em 8 membros de uma família açoreana (Família 1), afeta 4 das 25 sondas utilizadas (Figura 22). Apesar de não ter sido possível determinar o limite a 5', estimou-se que o *breakpoint* a 3' se localiza numa região de 5,7 Kb (entre as sondas 4 e 5) a cerca de 3,5 Kb a montante do gene *HBZ*. As sequências eliminadas incluem o gene *POLR3K* e a região HS-40.

Na segunda deleção de HS-40 só foram afetadas 2 das 25 sondas utilizadas (sondas 2 e 3) (Figura 25). Estimou-se que o *breakpoint* a 5' se localiza numa região de 60,2 Kb (correspondente à distância entre as sondas 1 e 2) a montante de HS-40 e o *breakpoint* a 3' numa região de 29,3 Kb (que corresponde à distância entre as sondas 3 e 4) a jusante de HS-40. Neste caso, apenas a região reguladora HS-40 terá sido eliminada.

A terceira deleção da região HS-40 é a maior das 4, estendendo-se possivelmente desde o telómero até ao seu *breakpoint* a 3' (região de 0,4 Kb a jusante do pseudo-gene *HBA1P*). Afeta 9 das 25 sondas de MLPA utilizadas (Figura 26). As regiões eliminadas incluem o gene *POLR3K*, HS-40, o gene *HBZ* e os pseudo-genes *HBZP*, *HBA2P* e *HBA1P* (Figura 30).

A quarta deleção de HS-40 provocou a diminuição dos rácios em 7 das 25 sondas utilizadas (Figura 27). Estimou-se que o *breakpoint* a 3' se situa numa região de 4,6 Kb (entre as sondas 7 e 8), onde se localizam os pseudo-genes *HBZP* e *HBA2P*. São eliminados os genes *POLR3K*, *HBZ* e a região HS-40 (Figura 30).

Os indivíduos afetados por estas deleções possuem um quadro de hipocromia e microcitose compatível com a deleção de dois dos quatro genes α normais. Contudo, como se pôde verificar, os quatro genes estão intactos. Os resultados obtidos do estudo do *cluster* α destes indivíduos, por MLPA, estão de acordo com o obtido noutros estudos semelhantes, em indivíduos com este tipo de deleção. Como referido anteriormente, o elemento MCS-R2 (HS-40) é o mais importante para a regulação da expressão dos genes α . A sua deleção conduz a uma redução severa da expressão dos genes α para valores inferiores a 5% (11,18,19,33).

Deleções não descritas

Foram, ainda, encontradas 3 deleções não descritas na literatura. Uma delas, encontrada em duas famílias de regiões próximas em Portugal (Família 2, de Leiria, e Família 3, de Pombal), remove ambos os genes *HBA* ($--/\alpha\alpha$). Estimou-se que esta deleção possui o seu *breakpoint* a 5' numa região de 3,3 Kb (distância entre as sondas 6 e 7) entre os genes *HBZ* e *HBZP* (Figura 23). O *breakpoint* a 3' situa-se numa região de 1,9 Kb (distância entre as sondas 24 e 25) a jusante de *HBA1*. Os genes eliminados incluem *HBA2* e *HBA1*, e os pseudo-genes *HBZP*, *HBA2P* e *HBA1P* (Figura 30).

Outra deleção, localizada no *cluster* α é muito extensa, afetando todas as sondas do respetivo kit (Figura 28). Pode-se constatar que todas as 25 sondas do kit têm a intensidade do sinal diminuída em cerca de 50%. Por isso, nada foi possível inferir quanto à localização dos seus *breakpoints*.

Uma terceira deleção, esta localizada no *cluster* β , provoca uma diminuição do sinal em 27 das 28 sondas utilizadas, nada se podendo concluir quanto à localização do *breakpoint* a 3' (Figura 29). Estimou-se que o *breakpoint* a 5' se localiza numa região de 1096,4 Kb (entre as sondas 1 e 2) a montante da região HBB-HS5. Todos os genes do *cluster* β são eliminados, num dos cromossomas, originando uma $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémia (Figura 31). O indivíduo no qual foi detetada esta deleção (indivíduo B7) apresentava história clínica de anemia neonatal grave, com necessidade de transfusões.

Patchwork $\alpha 212$

Este rearranjo foi detetado em dois membros de uma família de Ponta Delgada (Família 4). A análise do *cluster* α , por MLPA, revelou uma alteração em duas das sondas utilizadas (Figura 24). Posteriormente, a sequenciação do gene *HBA2* veio revelar a presença de uma pequena deleção/inserção que resulta da substituição de uma guanina (G), do gene *HBA2* na posição IVSII-119, por um octanucleótido (CTCGGCCCC) pertencente ao gene *HBA1* (Figura 33). De acordo com Law et al. (59) este gene híbrido terá sido resultado de um duplo *crossover* ou conversão génica entre os dois genes *HBA2* e *HBA1* de alelos normais desalinados. O estudo do gene híbrido $\alpha 212$, por estes autores, numa família indiana com co-hereditariedade do alelo $-\alpha^{3.7}$, sugere que a presença deste gene não está associada a microcitose. No entanto, sugerem que deve ser efetuado um estudo mais alargado em indivíduos não selecionados, para avaliar os

seus verdadeiros efeitos. Este re-arranjo foi ainda detetado noutro indivíduo (A30), também com hipocromia e microcitose, não relacionado com esta família.

5.2. Relação Genótipo/Fenótipo

Relativamente aos casos das famílias envolvidas neste estudo, observou-se a existência de uma relação entre a natureza da deleção e os parâmetros hematológicos dos indivíduos a elas pertencentes.

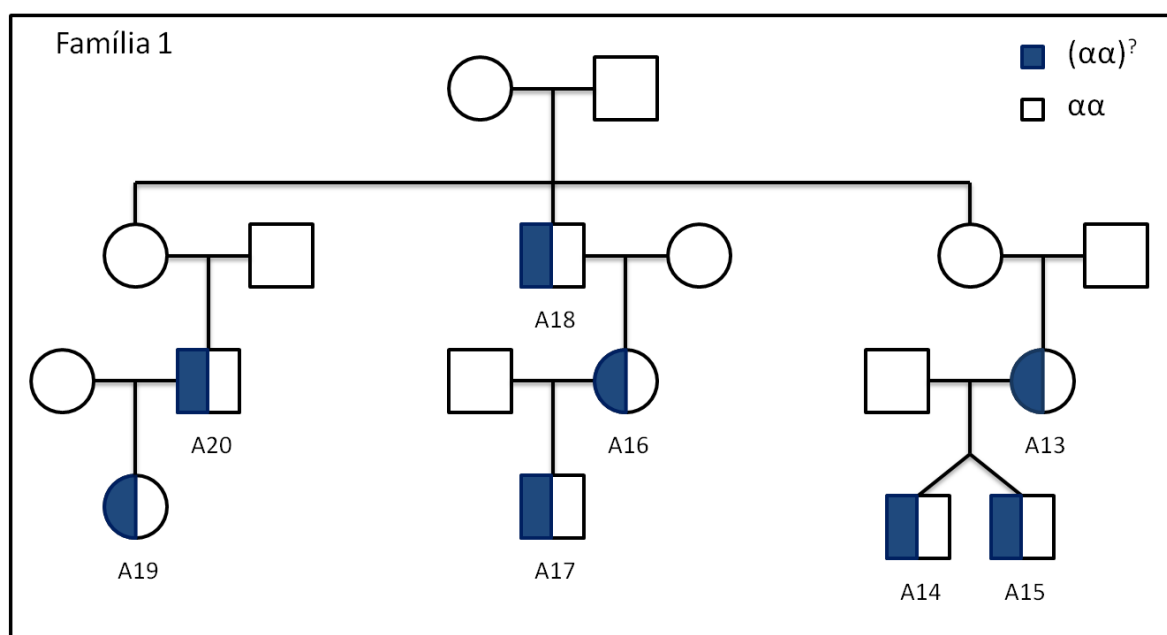


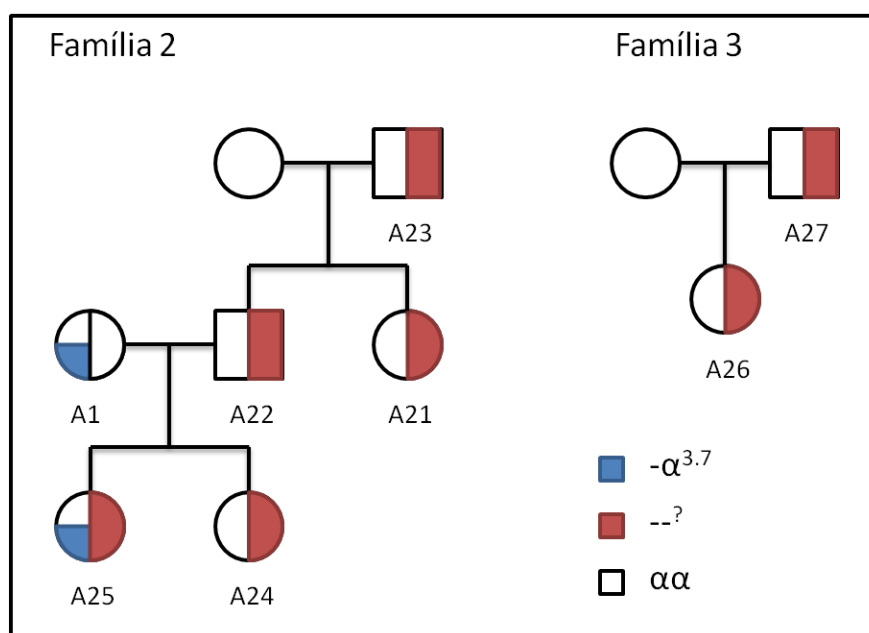
Figura 35. Árvore genealógica da Família 1.

O propósito da Família 1 era uma mulher açoreana de 25 anos (A19) com hipocromia e microcitose persistentes de causa indeterminada, Hb A₂ e Hb F normais. O pai (A20) e seis familiares da linha paterna (indivíduos A13 a A18) apresentavam o mesmo fenótipo (Figura 35). Após exclusão das deleções α mais frequentes ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$), efetuou-se o MLPA em amostras dos oito indivíduos (Figura 22), tendo-se chegado à conclusão que todos eram portadores de uma deleção que remove a região reguladora HS-40.

Esta deleção, do tipo $(\alpha\alpha)^2$ (em que os 4 genes α estão intactos), confere aos indivíduos afetados valores de MCV que variam de 64,0 a 73,2 fL, com uma média de 68,1 fL. A MCH varia de 18,2 a 23,0 pg, com uma média de 20,5 pg. Estes valores são bastante semelhantes aos encontrados nos indivíduos das Famílias 2 e 3 que possuem uma

deleção do tipo $--/\alpha\alpha$ (em que há, efetivamente, deleção dos dois genes α). Os adultos possuem valores de MCV compreendidos entre 60,0 e 68,7 fL, com uma média de 64,9 fL, e MCH entre 19,8 e 22,1 pg, com média de 20,9 pg.

No caso da Família 2, o propósito era uma criança de 4 anos (A25) com anemia hipocrômica e microcítica desde o nascimento (Figura 36). A mãe (A1) apresentava parâmetros hematológicos *borderline*, sendo heterozigótica para a deleção $-\alpha^{3.7}$. O pai (A22), avô paterno (A23) e tia paterna (A21) eram portadores de uma deleção que remove ambos os genes *HBA* de um dos cromossomos 16 ($--/\alpha\alpha$). Mais tarde, veio a verificar-se que a sua irmã (A24) também era portadora desta deleção.



A deleção encontrada possui o *breakpoint* a 5' entre os genes *HBZ* e *HBZP*. O *breakpoint* a 3' situa-se a jusante de *HBA1*. Os genes eliminados incluem *HBZP*, *HBA2P*, *HBA1P*, *HBA2* e *HBA1*. Dada a severidade da anemia do propósito, suspeitou-se que tivesse herdado ambas as deleções dos progenitores. O HPLC e a pesquisa de inclusões de Hb H, vieram confirmar o diagnóstico de Doença de Hb H. Esta deleção foi, ainda, detetada noutra família (Família 3): pai (A27) e filha (A26), ambos com hipocromia e microcitose de causa indeterminada, valores de Hb A₂ e Hb F normais.

Na Família 4 foi detetado um rearranjo, denominado *patchwork* α^{212} . O propósito era um homem açoreano de 32 anos (A28), com hipocromia e microcitose persistentes, pai (A29)

com o mesmo fenótipo, mãe e irmã normais (Figura 37). Após a exclusão das deleções α mais frequentes ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) a análise do *cluster* α , por MLPA, revelou uma alteração em duas das sondas utilizadas. Posteriormente, a sequenciação do gene *HBA2* veio evidenciar a presença desta pequena deleção/inserção.

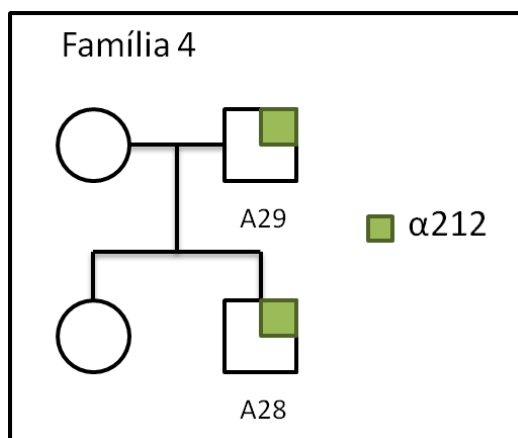


Figura 37. Árvore genealógica da Família 4.

Esta alteração foi, ainda, detetada no indivíduo A30, também com hipocromia e microcitose, não relacionado com a Família 4. Os dois indivíduos da Família 4 e o indivíduo A30 possuem valores de MCV compreendidos entre 73,8 e 78,3 fL, com média de 76,2 fL. A MCH varia entre 24,5 e 25,4 pg, com uma média de 24,8 pg. Da análise destes parâmetros pode concluir-se que este pequeno rearranjo é responsável pela hipocromia e microcitose observadas, o que vai de encontro ao obtido por Law et al. (59).

6. CONCLUSÃO

Dos 58 indivíduos com hipocromia, microcitose e valores de Hb A₂ normais estudados, 3 apresentavam a deleção - $\alpha^{3.7}$ em heterozigotia, 3 apresentavam deleção - $\alpha^{3.7}$ em homozigotia, 1 era heterozigótico para a deleção - $\alpha^{4.2}$, 1 era portador da deleção --^{LSB} e 6 eram portadores de ($\delta\beta$)⁰ Spanish . Detetou-se, ainda, em heterozigotia, a deleção --^{SEA} em 3 indivíduos e a deleção - $\alpha^{20.5}$ num indivíduo.

Foram detetadas, também, 6 grandes deleções no cluster α , uma grande deleção no cluster β , não descritas na literatura, e um pequeno rearranjo já descrito. A metodologia de MLPA, nestes casos, foi de grande utilidade para o esclarecimento do diagnóstico pois grande parte destas alterações não pôde ser detetada pelos métodos convencionais (PCR, sequenciação).

A identificação de grandes deleções nos *clusters* α e β -globínicos em indivíduos com hipocromia e microcitose, com Hb A₂ normal, é crucial para o aconselhamento genético de casais em que ambos são portadores de talassémia e que procurem a prevenção através do diagnóstico pré-natal. Para além disso, é importante caracterizar deleções que envolvem os genes embrionários do cluster α (ζ) e β (ϵ) pois estas, mesmo em heterozigotia, são clinicamente relevantes, podendo causar complicações severas durante a gravidez e no período neonatal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stryer L. Portrait of an Allosteric Protein. Biochemistry. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 1999. p. 147–80.
2. Hoffbrand A, Pettit J, Moss P. Doenças genéticas da hemoglobina. Fundamentos em Hematologia. 4th ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 79–98.
3. Wild B, Bain BJ. Investigation of abnormal haemoglobins and thalassaemia. Dacie and Lewis PRACTICAL HAEMATOLOGY. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone - Elsevier; 2006. p. 271–310.
4. in Ribeiro M. Beta-Thalassemia and Hb Lepore Heterozygotes: Phenotype-Genotype Correlation. Universiteit Maastricht; 1997. p. 12–29.
5. Bernet A, Sabatier S, Picketts DJ, Ouazana R, Morlé F, Higgs DR, et al. Targeted inactivation of the major positive regulatory element (HS-40) of the human alpha-globin gene locus. Blood. 1995 Aug 1;86(3):1202–11.
6. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. Genetics and Molecular Research. 2008 Jan;7(4):1045–53.
7. Higgs DR, Wood WG, Jarman a P, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, et al. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. Genes & Development. 1990 Sep 1;4(9):1588–601.
8. Thein S. Genetic modifiers of beta-thalassemia. Haematologica. 2005 ;649–60.
9. Michelson A. Boundaries of gene conversion within the duplicated human alpha-globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. Journal of Biological Chemistry. 1983;258(24):15245–54.
10. Földi J, Cohen-Solal M, Valentin C, Blouquit Y, Hollán SR, Rosa J. The human alpha-globin gene. The protein products of the duplicated genes are identical. European Journal of Biochemistry. 1980 Aug;109(2):463–70.

11. Hartevelde CL, Muglia M, Passarino G, Kielman MF, Bernini LF. Genetic polymorphism of the major regulatory element HS-40 upstream of the human alpha-globin gene cluster. *British Journal of Haematology*. 2002 Dec;119(3):848–54.
12. Bank A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;(6):4–7.
13. Collis P, Antoniou M. Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. *The EMBO Journal*. 1990;9(1):233–40.
14. Ryan TM, Behringer RR, Martin NC, Townes TM, Palmiter RD, Brinster RL. A single erythroid-specific DNase I super-hypersensitive site activates high levels of human beta-globin gene expression in transgenic mice. *Genes & Development*. 1989 Mar 1;3(3):314–23.
15. Forrester WC, Epner E, Driscoll MC, Enver T, Brice M, Papayannopoulou T, et al. A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes & Development*. 1990 Oct 1;4(10):1637–49.
16. Fraser P, Pruzina S, Antoniou M, Grosveld F. Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes & Development*. 1993;7(1):106–13.
17. Weatherall D. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health*. 2001;79(1).
18. Viprakasit V, Hartevelde C, Ayyub H. A novel deletion causing α thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. *Blood*. 2006;107(9):3811–2.
19. Voon HPJ, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1868–76.
20. Kohne E. Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Arzteblatt International*. 2011;108(31-32):532–40.

21. Das S. Beta Globin Gene and Related Diseases: A Review. *International Journal of Human Genetics*. 2002;2(3):139–52.
22. Muncie HJ, Campbell J. Alpha and Beta Thalassemia. *American Family Physician*. 2009;80(4):339–44.
23. Cappellini MD, Musallam KM, Cesaretti C, Taher A. CHAPTER 12: Thalassaemia intermedia. *The Iron Handbook*. 2009. p. 286–309.
24. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010;5(11):1–15.
25. Romão L, Inácio Â, Santos S, Ávila M, Faustino P, Pacheco P, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000;96(8):2895–901.
26. Silva AL, Ribeiro P, Inácio A, Liebhaber S a, Romão L. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*. 2008;14(3):563–76.
27. Inácio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, et al. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31):32170–80.
28. Danckwardt S. Abnormally spliced beta -globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood*. 2002;99(5):1811–6.
29. Danjou F, Anni F, Galanello R. Beta-thalassemia : from genotype to phenotype. *Haematologica - The Hematology Journal*. 2011;96(11):1573–5.
30. Carrocini GCS, Ondeí LS, Zamaro PJ a, Bonini-Domingos CR. Evaluation of HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high Hb F levels. *Genetics and Molecular Research*. 2011 Jan;10(4):3213–9.
31. Guzmán LF, Perea FJ, Morales-González KR, Sánchez-López JY, De la Cruz EI, Chávez-Velasco ML, et al. Characterization of the 5' and 3' breakpoints of the

- Spanish ($\delta\beta$)0-thalassemia deletion in Mexican patients. *Hemoglobin*. 2011; 35(1):80–3.
32. Shalev H, Landau D, Pissard S, Krasnov T, Kapelushnik J, Gilad O, et al. A novel epsilon gamma delta beta thalassemia presenting with pregnancy complications and severe neonatal anemia. *European Journal of Haematology*. 2012;2(4):1–7.
33. Hartevelde C, Higgs D. Alpha-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010;5(13):1–21.
34. Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011 Oct;134:498–506.
35. Higgs D, Vickers M, Wilkie A, Pretorius I, Jarman A, Weatherall D. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*. 1989;(73):1081–104.
36. Bowden D, Hill A. Different hematologic phenotypes are associated with the leftward (-alpha 4.2) and rightward (-alpha 3.7) alpha+-thalassemia deletions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1987;(79):39–43.
37. Hartevelde C, Traeger-Synodinos J, Ragusa A, Fichera M, Kanavakis E, Kattamis C, et al. Different geographic origins of Hb Constant Spring [α 2 codon 142 TAA→CAA]. *Haematologica*. 2001;(86):36–8.
38. Laosombat V, Wiryyasateinkul A, Chrangtrakul Y, Fucharoen S. Rapid detection of an α thalassemia variant (Hb Quong Sze). *Haematologica*. 2003 Jul;88(7):129–30.
39. Sollaino MC, Paglietti ME, Loi D, Congiu R, Podda R, Galanello R. Homozygous deletion of the major alpha-globin regulatory element (MCS-R2) responsible for a severe case of hemoglobin H disease. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2193–4.
40. Romao L, Osorio-Almeida L, Higgs DR, Lavinha J, Liebhaber S a. Alpha-thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha-globin structural genes. *Blood*. 1991 Sep 15;78(6):1589–95.

41. Daniels RJ, Peden JF, Lloyd C, Horsley SW, Clark K, Tufarelli C, et al. Sequence, structure and pathology of the fully annotated terminal 2 Mb of the short arm of human chromosome 16. *Human Molecular Genetics*. 2001 Feb 15;10(4):339–52.
42. Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease. *Hematology*. 2009;26–34.
43. Vichinsky EP. Alpha thalassemia major: new mutations, intrauterine management, and outcomes. *Hematology*. 2009;35–41.
44. Singer ST. Variable Clinical Phenotypes of α -Thalassemia Syndromes. *Scientific World Journal*. 2009;13(9):615–25.
45. Steinberg MH, Forget BG. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge University Press; 2001.
46. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The metabolic basis of inherited disease. *The Hemoglobinopathies*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
47. Cunha E, Bento MC, Oliveira A, Relvas L, Neves J, Gameiro M, et al. Hb Plasencia [α 125(H8)Leu→Arg (α 2)] is a Frequent Cause of α (+)-Thalassemia in the Portuguese Population. *Hemoglobin*. 2013; (*in press*)
48. Bento MC, Oliveira A, Neves J, Gameiro M, Cunha E, Coucelo M, et al. Hb Iberia [α 104(G11)Cys → Arg,TGC>CGC (α 2) (HBA2:c.313T>C)], a new α -thalassemic hemoglobin variant found in the Iberian Peninsula: report of six cases. *Hemoglobin*. 2012;36(6):515–25.
49. Tamagnini G, Ribeiro M, Valente V, Ramachandran M, Wilson J, Baysal E, et al. Hb Coimbra or alpha 2 beta (2)99(G1)Asp-->Glu, a newly discovered high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*. 1991;15(6):487–96.
50. Bento M, Ribeiro M, Cunha E, Rebelo U, Granjo E, Granado C, et al. Hb Vila Real [β 36(C2)Pro-->His]: a newly discovered high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*. 2000;24(1):59–63.

51. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Hemoglobinopathies associated with unstable hemoglobin. Williams Hematology. Internatio. McGraw-Hill; 1995. p. 650–3.
52. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2012 Jan;13(3):3245–76.
53. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. Blood. 2000;95(1):360–2.
54. Vives-Corrons JL, Pujades M a, Miguel-García a, Miguel-Sosa a, Cambiazzo S. Rapid detection of Spanish (delta beta)zero-thalassemia deletion by polymerase chain reaction. Blood. 1992 Sep 15;80(6):1582–5.
55. Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. Alpha zero-thalassemia due to recombination between the alpha 1-globin gene and an AluI repeat. Blood. 1985 Jun;65(6):1434–8.
56. Embury SH, Miller J a, Dozy a M, Kan YW, Chan V, Todd D. Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the alpha-thalassemia-2 genotype. The Journal of Clinical Investigation. 1980 Dec;66(6):1319–25.
57. Coelho A, Picanço I, Seuanes F, Seixas MT, Faustino P. Novel large deletions in the human alpha-globin gene cluster: Clarifying the HS-40 long-range regulatory role in the native chromosome environment. Blood cells, Molecules & Diseases. 2010 Aug;45(2):147–53.
58. Nava MP, Trejo JM, Aguilar-Luna C, Barros-Núñez P, Chávez MDLL, Magaña MT, et al. Molecular characterization of the--SEA alpha thalassemia allele in Mexican patients with HbH disease. Revista de Investigación Clínica; Organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición. 2006;58(4):313–7.
59. Law H, Luo H, Wang W, Ho JF V, Steinberg MH, Chui DHK, et al. Determinig the cause of patchwork HBA1 and HBA2 genes: recurrent gene conversion or crossing

over fixation events. Haematologica - The Hematology Journal. 2006;91(3):297–302.